

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

**VALOR PRONÓSTICO DE MARCADORES
ESTROMALES EN CÁNCER DE COLON**

TESIS DOCTORAL

MERCEDES HERRERA TORRES

MADRID 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

**VALOR PRONÓSTICO DE MARCADORES
ESTROMALES EN CÁNCER DE COLON**

Memoria de la Tesis que presenta:

Mercedes Herrera Torres

Para optar al grado de Doctora

Directores de Tesis:

Dra. Cristina Peña Maroto

Dr. Félix Bonilla Velasco

Tutor de Tesis:

Dr. Carlos Sentís Castaño

IIS Puerta de Hierro-Majadahonda

Madrid 2014

EL Dr. FÉLIX BONILLA VELASCO, JEFE DE SECCIÓN DE ONCOLOGIA MÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA, Y LA Dra. CRISTINA PEÑA MAROTO, INVESTIGADORA CONTRATADA MIGUEL SERVET DE LA FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA,

CERTIFICAN: Que Doña MERCEDES HERRERA TORRES, DNI 75107788T, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “VALOR PRONÓSTICO DE MARCADORES ESTROMALES EN CÁNCER DE COLON”, y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser presentado y sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 5 de Mayo 2014



Dr. Félix Bonilla Velasco



Dra. Cristina Peña Maroto

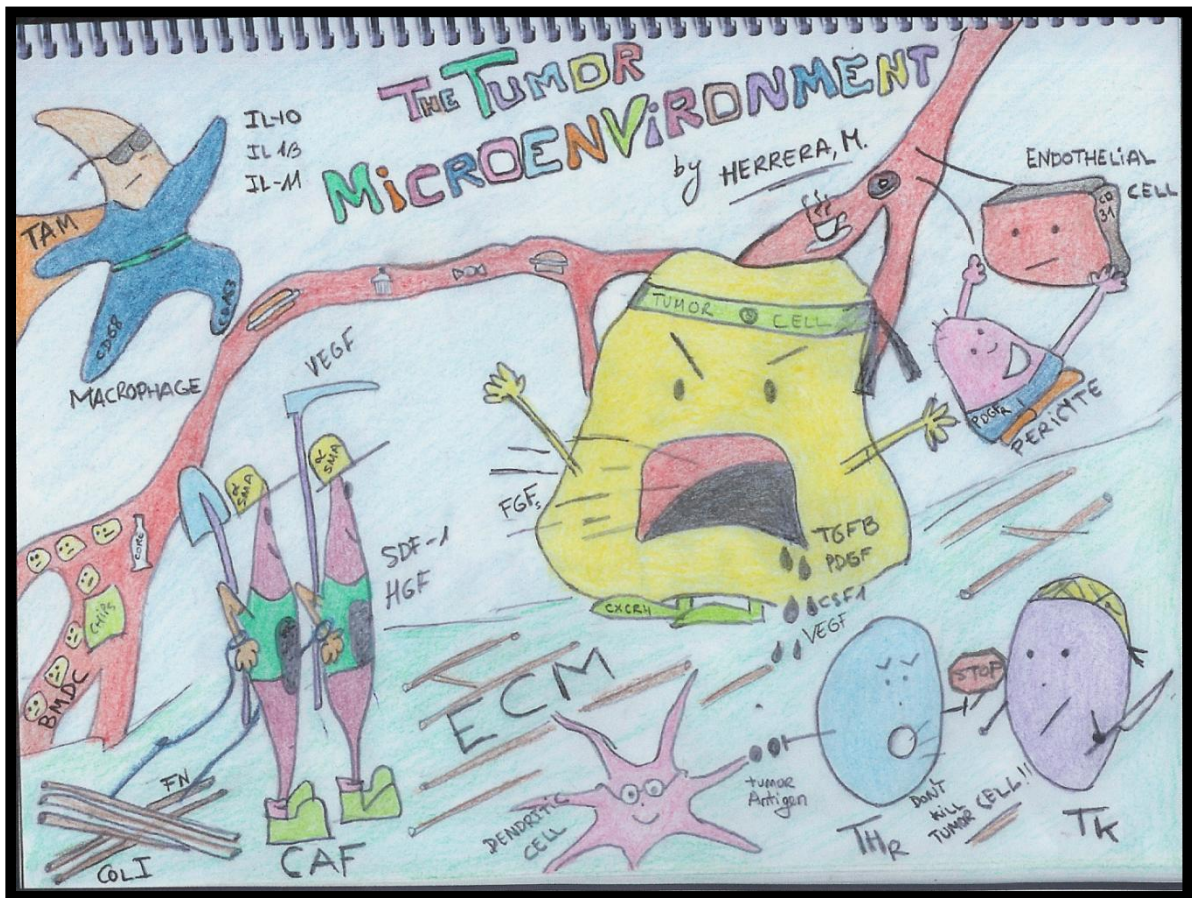
Dr. Carlos Sentís Castaño

Tutor

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Félix Bonilla y a la Dra. Cristina Peña su interés en mi formación científica, así como la oportunidad que me han brindado de trabajar en investigación frente al cáncer. He sido muy afortunada por haber podido aprender de la mano de estos dos grandes profesionales que son aún mejores personas. También agradezco al Dr. Carlos Sentís su ayuda como tutor de esta Tesis.

Agradezco a las distintas instituciones que han financiado personalmente mi trabajo estos años: la Asociación Española contra el Cáncer (AECC), la Conserjería de la Comunidad de Madrid (CAM) y al Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Por supuesto, también a otras entidades que han apoyado económicamente nuestra labor durante este tiempo como el Ministerio de Economía y Competitividad y el Banco Santander.

A mis compañeros de laboratorio, por sus aportaciones científicas, y en especial, por su amistad y las risas compartidas, a Alberto, Vanesa, Marta, Javier, Coral, Beatriz Soldevilla y Beatriz Gil. También a todos los compañeros del laboratorio de Inmunología Molecular, “Los Vecinos”, siempre dispuestos a ayudar y colaborar en todo momento.

A la Dra. Paloma Martín y al Dr. Rufo Rodríguez, de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital-Puerta de Hierro Majadahonda y del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, respectivamente, por su contribución a este trabajo.

Al Dr. Abul B.M.M.K. Islam, del Departamento de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Universidad de Daka (Bangladesh) por su importante colaboración en este estudio.

A mis amigas, por haberme alentado a seguir siempre adelante, en especial a Julia, Sara, Estela, Rosana, Eliana, Almudena y Myriam; y a mis compañeras de la UAM, Conchi, Monste, Virginia y Nargisse.

A mis hermanas, Encarni y Loren, y a mis cuñados, José y Manuel, que siempre han estado pendientes de mí y me han apoyado en todo momento. Y cómo no mis “sobris”: Manuel, Jose Antonio, José y Lucas. Espero vuestras Tesis, chicos.

Y por supuesto a mis padres, Lucas y Mercedes, por haberme dado lo mejor de ellos mismos y haberme ayudado de manera incondicional.

A mis padres

RESUMEN

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más frecuentes en los países desarrollados de Norte América y Europa. Las investigaciones desarrolladas en los últimos años han demostrado la importante contribución del microambiente en la progresión tumoral, de manera que el conocimiento de la activación del estroma y la caracterización molecular de la comunicación entre células tumorales y estromales pueden ser útiles en la identificación de nuevos marcadores con valor pronóstico y nuevas dianas terapéuticas.

En el presente estudio se ha determinado la implicación pronóstica de diferentes marcadores característicos de estroma activado en pacientes con carcinoma colorrectal. Así, se han analizado los niveles de ARNm y de proteína de los marcadores de fibroblastos asociados a tumores, α -SMA, FSP1 y FAP, y de macrófagos M2, DCSIGN y CD163, en muestras de tejido normal y tumoral de una serie extensa de pacientes. Se ha observado asociación entre la expresión de estos marcadores estromales y las variables clínicas recidiva y *exitus* de los pacientes. Asimismo, se ha determinado que los niveles de expresión de estos marcadores considerados de manera conjunta constituyen un marcador pronóstico más adecuado que los marcadores CAF o los marcadores M2 de manera individual, identificando pacientes con peor pronóstico particularmente en aquellos que están en etapas avanzadas de la enfermedad.

Además, en este estudio se ha demostrado la importancia de los cambios de expresión génica en los fibroblastos asociados a tumores de colon en la progresión del cáncer y se ha definido una firma de expresión génica en los mismos que incluye nuevos marcadores moleculares con claro valor predictivo en la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal. Apoyando los datos previamente comentados, el valor pronóstico de estos genes también es más evidente en aquellos pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad. Para ello, se han establecido cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores de colon que han sido clasificados en base a su capacidad para promover la migración en células tumorales, sus características de activación y sus perfiles de expresión molecular. También se ha detectado expresión de marcadores de pluripotencia y capacidad de diferenciación en los fibroblastos asociados a tumores. Los nuevos marcadores descritos están implicados en funciones de importancia inmediata para el microambiente del tumor como la regulación de la producción de citoquinas y la modulación del sistema inmune.

SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common cancers in developed countries of North America and Europe. Recent studies on cancer research have emphasized the significant contribution of the microenvironment on tumor progression. Consequently, the knowledge of stroma activation process and the molecular characterization of the communication between tumor and stromal cells could be useful to identify new prognostic markers and therapeutic targets.

In the present study we have determined the prognostic value of different characteristic markers of activated stroma in patients with colorectal carcinoma. Thus, we have analyzed the mRNA and protein levels of the cancer associated fibroblasts markers, α -SMA, FSP1 and FAP, and the M2 macrophages markers, DCSIGN and CD163, in normal and tumor tissue samples of a large patient series. Therefore, association was observed between the expression of these stromal markers and the patient's clinical variables recurrence and exitus. Moreover, to discriminate patients with worse prognosis, the combined expression levels of these markers constitutes a better prognostic variable than CAF or M2 markers considered individually. This combined variable could be a decisive factor in the survival of advanced-stage patients.

Additionally, this study has demonstrated the relevant gene expression alterations in tumor associated fibroblasts on colon cancer progression. These modifications imply a gene expression signature which includes new molecular markers with clear predictive value on the survival of colorectal cancer patients. Supporting the data previously discussed, the prognostic value of these genes is also stronger in patients with disease advanced stages. For this purpose, we established primary cultures of colon cancer associated fibroblasts that were classified based on their ability to promote tumor cell migration, their activation characteristics and their molecular expression profiles. In addition, we detected expression of pluripotency markers and differentiation capacity of tumor associated fibroblasts. The new described markers are related with functions of immediate importance for the tumor microenvironment as regulation of cytokine production and immunomodulation.

ÍNDICES

INTRODUCCIÓN	1
1. Aspectos generales del cáncer	2
2. Ciclo celular y cáncer	3
3. Cáncer colorrectal	6
3.1. Factores de Riesgo	7
- Factores de Riesgo Externos	7
- Factores de Riesgo Individuales	9
3.2. Clínica y diagnóstico	11
3.3. Estadío y pronóstico	12
4. Alteraciones moleculares asociadas con cáncer colorrectal	12
4.1. Oncogenes	13
4.2. Genes supresores	14
4.3. Genes reparadores	16
5. El microambiente tumoral	16
5.1. Componentes	17
5.1.1. Fibroblastos asociados al tumor	18
- Origen	19
- Alteraciones genéticas	19
- Interacción con otros tipos celulares	20
5.1.2. Células inmunes: el microambiente inflamatorio	21
- Poblaciones de macrófagos	21
- Papel de los macrófagos asociados a tumores	22
5.1.3. Otros componentes	22
- Células endoteliales y pericitos	22
- La matriz extracelular	23
5.2. Mecanismos de señalización del microambiente promotores de tumorogénesis	24
- Inducción de la proliferación, migración, invasión y angiogénesis	24

- Amortiguación de la acidificación del medio tumoral	25
- Contribución a la Transición Epitelio Mesénquima	25
- Influencia en la captación y en la sensibilidad de fármacos	26
5.3. El microambiente como nueva diana terapéutica	26
- Drogas aprobadas dirigidas al microambiente tumoral	27
- Enfoques experimentales dirigidos a los CAF	27
- Pro-drogas experimentales impermeables a las células	28
- Inmunoterapia experimental	28
OBJETIVOS	30
METODOLOGÍA	33
1. Pacientes y muestras humanas	34
2. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos	35
3. Extracción de ARN de las muestras y transcripción reversa	36
a. Procedimiento	36
b. Cuantificación de las extracciones	36
c. Transcripción Reversa	36
4. Cuantificación a tiempo real (Real-Time PCR)	37
5. Cultivos celulares	40
6. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia	40
7. Senescencia celular	41
8. Ensayo de contracción de geles de colágeno	41
9. Ensayos de migración celular	41
10. Ensayos de diferenciación celular	42
11. Array de expresión génica	42
11.1. Análisis de datos	42
11.2. Clasificación ontológica y de vías moleculares enriquecidas	43
11.3. Firma de expresión génica	43
11.4. Dicotomización de los pacientes de cáncer de colon respecto a la expresión de la firma génica	44
12. Análisis estadístico	44

RESULTADOS	46
1. Análisis de marcadores moleculares característicos de estroma activado en cáncer colorrectal. Valor aplicable	47
1.1. Datos descriptivos de la serie de pacientes y de los marcadores de estroma	47
1.2. Asociación de la expresión de ARNm de los marcadores CAF y de macrófagos M2 con las características clínicas de los pacientes con CC	50
1.3. Asociación de la expresión de ARNm de los marcadores de CAF y de macrófagos M2 con la supervivencia de los pacientes con CC	50
1.4. Asociación de la combinación de marcadores de CAF y de macrófagos M2 con la supervivencia de los pacientes con CC	55
1.5. Asociación de la combinación de marcadores CAF y de macrófagos M2 con la supervivencia de los pacientes con CC según el estadio de los tumores	56
2. Características funcionales de los fibroblastos asociados a tumores y perfil génico con valor discriminativo en pacientes con cáncer colorrectal	59
2.1. Los CAF primarios de colon presentan características de miofibroblastos	59
2.2. Los CAF primarios de colon inducen efectos pro-migratorios sobre las células tumorales de forma paracrina	61
2.3. Los CAF más pro-migratorios muestran propiedades de fibroblasto activo	64
2.4. Los CAF más pro-migratorios muestran marcadores de pluripotencia	66
2.5. Identificación de genes desregulados en los subtipos pro-migratorios de CAF	68
2.6. Rutas desreguladas en los grupos pro-migratorios de CAF	68
2.7. El perfil génico de CAF más pro-migratorios es un marcador de mayor agresividad tumoral en pacientes con CC	71

2.8. Validación del perfil génico de los CAF como genes con valor informativo de la supervivencia de los pacientes con CC	73
2.9. La vía molecular Golgi también con valor pronóstico en pacientes con CC	77
DISCUSIÓN	79
1. Análisis de marcadores moleculares característicos de estroma activado en cáncer colorrectal. Valor aplicable	80
2. Características funcionales de los fibroblastos asociados a tumores y perfil génico con valor discriminativo en pacientes con cáncer colorrectal	83
3. Potencial de aplicabilidad	88
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFIA	93
- Referencias Bibliográficas	94
- Páginas WEB	118
ANEXOS	119
1. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients	120
2. Functional Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts from Human Colon Tumors Shows Specific Prognostic Gene Expression Signature	128

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los genes de referencia	38
Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los marcadores estromales analizados	38
Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para amplificación de los genes marcadores de pluripotencia analizados	39
Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los genes seleccionados para la validación del array de expresión génica	39
Tabla 5. Resumen de los valores de expresión de los marcadores CAF y M2 en la serie de pacientes con CC	48
Tabla 6. Correlación entre los niveles de expresión de los marcadores CAF y M2	48
Tabla 7. Análisis Multivariante de Cox para la expresión de los marcadores CAF-M2 y la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de los pacientes con CC	58
Tabla 8. Interacción estadística entre la variable CAF-M2 y el estadio patológico en el pronóstico de la supervivencia global de los pacientes con CC	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genes implicados en la tumorigénesis y ciclo celular	4
Figura 2. El microambiente tumoral: componentes y moléculas implicadas en la comunicación entre las células tumorales y estromales	18
Figura 3. Inmunohistoquímica y expresión cuantitativa de ARNm de los marcadores CAF y de macrófagos M2	49
Figura 4. Análisis de Kaplan-Meier entre los niveles de expresión de los marcadores de CAF y de macrófagos M2, individualmente, y la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con CC	52
Figura 5. Análisis de Kaplan-Meier entre los niveles de expresión de los marcadores de CAF y los de macrófagos M2 (individualmente) y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CC	53
Figura 6. Análisis de Kaplan-Meier de los niveles de expresión de los marcadores de CAF y los de macrófagos M2 (individualmente) y la supervivencia global en pacientes con CC	54
Figura 7. Análisis de Kaplan-Meier entre la expresión de los marcadores CAF y los de macrófagos M2 y la supervivencia de los pacientes CC (A, B). Curvas de Kaplan-Meier entre la variable expresión de marcadores de CAF junto con la variable para expresión de marcadores de macrófagos M2 y supervivencia de los pacientes CC según el estadio patológico (C, D). Curvas de Kaplan-Meier entre la variable CAF-M2 y la supervivencia en relación con la localización del tumor en pacientes con CC (E, F)	57
Figura 8. Establecimiento y caracterización de CAF primarios de pacientes con CC	60
Figura 9. Los CAF estimulan la migración de células humanas tumorales de colon (A). Comparación entre los efectos paracrinos pro-	

migratorios derivados de los CAF y los FN sobre las células de colon (B). Crecimiento celular de los cultivos CAF (C)	62
Figura 10. Validación de los efectos pro-migratorios observados en las células tumorales de colon	63
Figura 11. Los efectos paracrinos pro-migratorios derivados de los CAF están asociados con características de fibroblasto activo y con marcadores de pluripotencia	65
Figura 12. Análisis de la pluripotencia de los CAF	67
Figura 13. Agrupación de los CAF y análisis de enriquecimiento funcional de genes DE	70
Figura 14. Perfil génico de los CAF y su valor predictivo sobre la supervivencia en pacientes con CC	72
Figura 15. Validación de los genes desregulados en los CAF mediante RT-PCR	74
Figura 16. Análisis de expresión de genes seleccionados aleatoriamente de la “firma génica” de los CAF y su relación con la supervivencia de los enfermos	75
Figura 17. Combinación de genes de la “firma génica” de los CAF y su relación con la supervivencia	76
Figura 18. Expresión de los genes del módulo Golgi en pacientes con CC y su valor pronóstico	78

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

El cáncer es un grave problema de salud pública ya que constituye la primera causa de muerte a nivel mundial, en el año 2008 representó 7,6 millones de muertes (en torno al 13% de todas las muertes). Además, se prevé que esta cifra siga aumentando a más de 13,1 millones en el año 2030, debido en parte a un envejecimiento de la población mundial, según el informe Globocan de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Globocan 2008, IARC, 2010).

En los países más desarrollados, el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares y en algunos casos incluso llega a superar a éstas. Los estudios epidemiológicos señalan la existencia de esta nueva tendencia en los países en desarrollo, sobre todo en países de renta media de América del Sur y Asia. No obstante, más de la mitad de todos los casos de cáncer se producen en países en desarrollo, siendo los tipos más frecuentes pulmón, colon, próstata y mama. En el caso de los países en desarrollo, los más frecuentes son hígado, estómago y cérvix (www.who.int/cancer/en).

En España, la incidencia global prevista de cáncer en el año 2015 es de 222.069 personas (136.961 varones y 85.108 mujeres), siendo el tipo más frecuente el cáncer colorrectal, por delante, en términos globales, del cáncer de pulmón y del cáncer de mama (www.seom.org).

Hay una serie de factores de riesgo comunes que se han relacionado con el desarrollo de cáncer: un estilo de vida poco saludable (el tabaco, el alcohol, la dieta inadecuada y la falta de actividad física), la exposición en el trabajo a determinados carcinógenos (por ejemplo, amianto) o a carcinógenos ambientales (por ejemplo, la contaminación del aire en interiores), la radiación (por ejemplo, la radiación ultravioleta e ionizante), y algunas infecciones (como la hepatitis B o infección por el virus del papiloma humano) (www.who.int/cancer/en).

El cáncer es una enfermedad genética y heterogénea, caracterizada por el crecimiento excesivo y descontrolado de las células tumorales que invaden y dañan tejidos y órganos. La Biología Molecular está permitiendo ampliar el conocimiento sobre su

origen, desarrollo y extensión, así como de las vías implicadas en resistencia a tratamientos. De esta manera, se están identificando nuevas dianas del tumor y de su entorno que permiten el desarrollo de alternativas terapéuticas.

Una célula cancerosa tiene como característica fundamental la desregulación del ciclo celular, y por lo tanto, la pérdida del control del crecimiento y su posterior división, dando lugar al tumor primitivo. Aquellas células que vayan adquiriendo alteraciones en su material genético que les proporcionen una ventaja de crecimiento, se irán constituyendo como las mayoritarias en el tumor. Las células tumorales en las sucesivas divisiones van acumulando alteraciones en su material genético, algunas de las cuales permiten a las células tener capacidad invasiva y así poder intravasarse los vasos sanguíneos y linfáticos para después extravasarse en otros tejidos y órganos formando las metástasis a distancia.

2. CICLO CELULAR Y CÁNCER

Las células al dividirse pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división celular, conocida como ciclo celular. El ciclo celular está formado por tres fases principales: interfase, mitosis (M) y citocinesis (Figura 1). Las células que no están en división se encuentran en una fase conocida como G0. Antes de que una célula comience la mitosis y se divida efectivamente, debe duplicar su ADN, sintetizar mayor cantidad de histonas y otras proteínas asociadas con el ADN de los cromosomas, producir una reserva adecuada de orgánulos para las dos células hijas y ensamblar las estructuras necesarias para que se lleven a cabo la mitosis y la citocinesis. Estos procesos preparatorios comprendidos entre dos divisiones, que ocupan casi el 95% del ciclo, ocurren durante el periodo de interfase del ciclo celular, el cual comprende tres etapas: G1, S y G2.

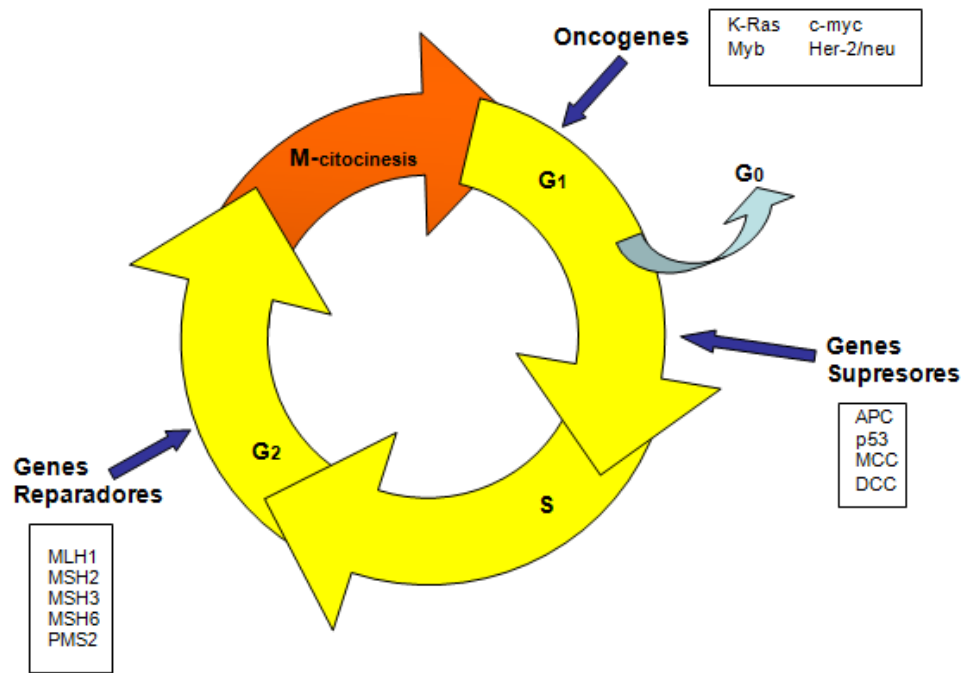


Figura 1. Genes implicados en la tumorigénesis y ciclo celular

En la fase G1, periodo inmediatamente posterior a una división celular, la célula aumenta su tamaño, sus enzimas, ribosomas y mitocondrias, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número. En la fase S se produce la duplicación del material genético, de manera que cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas hermanas idénticas. La fase G2 comprende el periodo entre la fase final de síntesis y el inicio de la división. Los cromosomas recién duplicados comienzan a condensarse en una forma compacta y comienzan a ensamblarse las estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto completo de cromosomas a cada célula hija. Durante la mitosis, la envoltura nuclear se rompe y se forman las fibras del huso y el cinetocoro para separar dos conjuntos idénticos de cromosomas cada uno en un polo celular. La citocinesis es la división del citoplasma que, habitualmente, pero no siempre, acompaña a la mitosis, que es la división del núcleo.

En todas las fases existen puntos de control encargados de regular el paso a la siguiente fase: en la fase G1, el punto de restricción R, en el que la célula comprueba que no hay alteraciones en el ADN; en la fase G2, el punto de control G2-M, donde la célula asegura que ha completado la replicación del ADN y ha duplicado su masa; y por último, el punto de control M, en el cual la célula verifica que todos los cromosomas se encuentran alineados en el huso acromático. Si ocurriesen fallos en alguno de estos

puntos de control, el ciclo celular podría acelerarse dando lugar a una proliferación descontrolada de las células (Muñoz, 1997).

Diferentes causas pueden desencadenar el desarrollo de un tumor, pero todas ellas tienen en común la acumulación de mutaciones, ya sean somáticas o germinales, sobre un sustrato común dentro de la célula que engloba a los genes reguladores del inicio, progresión, integridad y fin del ciclo celular. Estos genes se pueden dividir en tres grupos: **oncogenes**, **genes supresores** y **genes de reparación**. Cada uno de estos tipos de genes tiene su papel principal en alguna de las fases del ciclo celular (Figura 1).

Los **oncogenes** actúan como aceleradores del crecimiento durante la fase G1. Son formas activadas de los proto-oncogenes, los cuales codifican un grupo de proteínas que intervienen en las señales de transducción (transmisión de información desde la membrana plasmática al núcleo) o en la regulación de la expresión génica (Gruber *et al.*, 1999). Estos procesos son necesarios principalmente durante el desarrollo embrionario y en determinados momentos en la edad adulta, como en la cicatrización de heridas o en procesos inflamatorios. Cuando se producen alteraciones genéticas como mutaciones, amplificación génica o translocaciones, que provocan su expresión de forma excesiva, se conduce a la desregulación de procesos como proliferación celular o muerte celular programada, también conocida como apoptosis. La sobreexpresión de los oncogenes, que puede ser debida a un solo alelo alterado, estimula el crecimiento, la invasividad y la transformación celular, pudiendo generar un tumor.

El segundo grupo lo forman los **genes supresores**, los cuales actúan antes de la entrada en la fase S y su función normal es la inhibición del ciclo celular. Al contrario que en los oncogenes, se necesita su inactivación para favorecer la aparición y desarrollo del tumor (Carson *et al.*, 2004). Esta inactivación puede ser debida a una pérdida de expresión ó a la expresión de una proteína no funcional y para que se dé, es necesario que los dos alelos del gen se encuentren inactivos. Según la teoría de Knudson (Knudson, 1985), una primera mutación en un alelo adquirida por vía germinal o bien somáticamente produciría la inactivación de un alelo, mientras que el segundo sería inactivado por alguna otra alteración genética, como pérdidas de heterozigosidad o alguna alteración epigenética como la metilación de los promotores génicos.

El último grupo lo forman los **genes reparadores**, los cuales actúan en fase G2 justo antes de la condensación de los cromosomas para entrar en mitosis. Son los responsables de la reparación de los errores en la cadena de ADN producidos durante la replicación o inducidos por radiaciones o agentes químicos, manteniendo así la integridad genómica. En el ADN existen secuencias cortas de bases de nucleótidos que se repiten cientos de veces denominados microsatélites (Su, 2004). En estas secuencias, durante la replicación del ADN, se pueden dar deslizamientos de la ADN polimerasa produciendo desapareamientos de bases o bucles creados por inserción-delección de bases. Son los genes de reparación de errores de replicación los encargados de eliminar estas alteraciones (Boland, 1996). La pérdida de funcionalidad en alguno de estos genes conduce a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma (efecto mutador), teniendo efectos desestabilizadores en la replicación celular cuando aparecen y no son reparadas en proto-oncogenes y genes supresores de tumores.

3. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer de colon (CC) es una de las neoplasias más frecuentes en los países desarrollados de Norte América y Europa (Jessup *et al.*, 1996). La etiología del CC se desconoce, aunque se piensa que es multifactorial debiéndose a una interacción entre predisposición genética y factores ambientales como hábitos dietéticos y estilo de vida, explicándose así el elevado número en los países desarrollados y la menor frecuencia en África y Asia (Troisi *et al.*, 1998).

España ocupa una posición intermedia en incidencia y mortalidad, si nos comparamos con Estados Unidos y otros países Europeos (Jemal *et al.*, 2004). Según datos del Instituto Nacional de Estadística, en el año 2009 fallecieron en España 14.238 personas debido a CC, lo que representó la segunda causa de muerte por cáncer (www.aecc.es). En las estimaciones realizadas para el año 2015, se prevé que el CC será el cáncer más frecuente en España siendo la incidencia similar en hombres y mujeres (17,444 hombres y 12,786 mujeres), con un ligero predominio en los hombres (www.seom.org).

A pesar de que se han identificado distintos factores de riesgo, en la mayoría de los casos, alrededor del 75%, aparece en individuos sin factores de predisposición conocidos, dando lugar a los CC esporádicos. En el restante 25% existen antecedentes familiares, pero solo aproximadamente un 10% se relacionan con un componente

hereditario sugerente de una contribución genética, exposición común a agentes potencialmente cancerígenos entre los miembros familiares, o ambas cosas simultáneamente (Salovaara *et al.*, 2000). Los estudios disponibles en la actualidad, referentes a las modificaciones en la dieta, en el estilo de vida o en quimiopprofilaxis, no han conseguido demostrar una clara utilidad en la prevención, por lo tanto, los esfuerzos deberían encaminarse al diagnóstico precoz de la lesión, recomendando que ésta comience a partir de los 50 años en la población general sin aumento de riesgo (Bond, 1997). En Estados Unidos, se ha observado una ligera disminución en la incidencia, gracias a las intensas medidas de cribado y a la extirpación precoz de los adenomas, que en muchos casos constituyen la lesión inicial del CC (Winauer *et al.*, 1993).

Existe un amplio espectro de neoplasias en los tumores colorrectales, que van desde formas de crecimiento benigno hasta cánceres invasivos, predominantemente de estirpe epitelial. Las lesiones han sido clasificadas en tres grupos: pólipos no neoplásicos, pólipos neoplásicos (pólipos adenomatosos, adenomas) y cánceres propiamente dichos. Entre los pólipos no neoplásicos se incluyen los pólipos hiperplásicos, juveniles, inflamatorios y linfoides. Generalmente, no son considerados como precursores de tumores, aunque algunos autores han descrito un aumento en el riesgo de padecer CC en algunas familias con múltiples miembros afectados de poliposis juvenil e hiperplasia (Rashid *et al.*, 2000). Por otro lado, parece estar bien establecido que los pólipos adenomatosos son lesiones benignas susceptibles de sufrir transformaciones malignas, las cuales se clasifican en tres tipos histológicos ordenados según el aumento de su potencial maligno: tubular, tubulovelloso y velloso.

3.1. FACTORES DE RIESGO

Factores de Riesgo Externos

Existen una serie de factores de riesgo que dependen de diferencias geográficas (Satia-Abouta *et al.*, 2004), aumentado la incidencia del CC en zonas con mayor desarrollo económico. La adquisición de los hábitos de vida por parte de habitantes de zonas menos desarrolladas que emigran a zonas con mayor desarrollo, tiende a igualar la incidencia de CC (Willet, 2000).

Entre estos factores de riesgo se encuentran:

Dieta

Un alto contenido en grasas se ha asociado con el desarrollo de CC, debido a que aumenta la excreción de ácidos biliares primarios que se transforman en la luz colónica en secundarios con efecto carcinogénico (Murtaugh *et al.*, 2004). Por otro lado, el consumo de verduras es importante en la reducción del riesgo de CC debido a su alto contenido en sustancias protectoras (Steinmetz *et al.*, 1994). Una dieta rica en fibra reduce los niveles de ácidos biliares, aumenta los de ácidos grasos y produce niveles de insulina en suero más estables, teniendo un efecto protector (Boland y Kolars, 1992; Rao *et al.*, 2001; Giovannucci, 2001).

El calcio y la vitamina D tienen efecto antiproliferativo debido a la formación de sales insolubles con ácidos grasos ionizados y ácidos biliares en la luz del colon (Rozen *et al.*, 1989). La vitamina A, así como sus precursores, la vitamina B, la C y la E tienen propiedades antioxidantes que reducen la formación de daño en el ADN producida por radicales libres (Biasco *et al.*, 1992). El folato y la metionina han sido asociados a una disminución del CC. Están implicados en funciones celulares fundamentales, como regulación de genes y reparación/replicación de ADN (Little *et al.*, 2003).

El café y té parecen tener efecto protector en el CC (Terry *et al.*, 2001; Arab e Il'yasova, 2003). El café es una mezcla compleja de sustancias, que al menos individualmente, tiene propiedades preventivas, aunque también pueden producir mutaciones. El té contiene catequinas que son poderosos antioxidantes. En concreto, el té verde tendría más propiedades protectoras ya que las catequinas están menos oxidadas.

Estilo de vida

Los fumadores tienen mayor riesgo de desarrollar CC debido probablemente al efecto carcinógeno de componentes del tabaco (Knekt *et al.*, 1998). Un aumento de la actividad física ha sido relacionado con una disminución del riesgo de CC (McTiernan *et al.*, 1998). Esto podría ser debido a un mayor estímulo del tránsito intestinal, disminución de la concentración de prostanglandina E, o por prevenir la hiperinsulinemia (Giovannucci, 2001). La obesidad es otro factor que se ha relacionado con aumento del riesgo de CC, así como un consumo elevado de alcohol. El alcohol

disminuye la absorción de folato y, por lo tanto, afecta a la síntesis de ADN y al ciclo de metilación (Pedersen *et al.*, 2003).

Factores de Riesgo Individuales

Existen diversas condiciones que pueden comportarse como factores de riesgo en una persona:

Edad

A partir de 50 años, con el aumento de la edad, se ha observado un aumento de la incidencia de pólipos adenomatosos (lesión precancerosa), adenomas múltiples y CC (O'Brien *et al.*, 1990; Landis *et al.*, 1998). También se ha relacionado con una mayor frecuencia de CC localizado en el colon derecho (Cooper *et al.*, 1995).

Cáncer colorrectal previo

Los individuos con antecedentes de neoplasia colorrectal tienen un riesgo mayor de desarrollar un tumor recurrente (metacrónico) y/o pólipos adenomatosos (Otchy *et al.*, 1996). De los pólipos adenomatosos surgen la mayoría de los CC siguiendo la secuencia adenoma-carcinoma. Además, el riesgo de que los adenomas desarrollen carcinomas aumenta en aquellos con componente vellosos, mayores de 1cm y múltiples (Shinya y Wolf, 1979).

Antecedentes familiares de CC y Síndromes Hereditarios

Los individuos con familiares de primer grado que han desarrollado CC tienen un riesgo relativo de 1.72 con respecto a la población general de desarrollar dicho tumor. Este riesgo se incrementa cuando el familiar en el momento del diagnóstico es menor de 55 años, o existen dos familiares de primer grado con CC (Fuchs *et al.*, 1994). Excluyendo los síndromes hereditarios, comentados a continuación, aún no se han encontrado genes concretos que se relacionen con una predisposición hereditaria. Sin embargo, existen antecedentes familiares en el 25% de los pacientes con CC (Boland, 2004).

Aproximadamente el 10% de los CC están etiopatogénicamente relacionados con factores genéticos conocidos. Estos factores dan lugar a unos síndromes hereditarios (Lynch y Hoops, 2002; Kinzler y Vogelstein, 1996) que se engloban mayoritariamente

en dos formas bien caracterizadas: poliposis adenomatosa familiar (FAP, del Inglés, Familial Adenomatous Polyposis), por alteraciones genéticas de el gen APC (Kinzler *et al.*, 1991; Spirio *et al.*, 1993) y cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC, del Inglés, Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer), por mutaciones germinales en genes reparadores del ADN (Leach *et al.*, 1993; Nicolaides *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994; Miyaki *et al.*, 1997).

Otra forma hereditaria es el cáncer colorrectal familiar (FCC, del Inglés, Familial Colorectal Cancer), con la existencia de familias con una clara agregación de adenomas o CC (Fuchs *et al.*, 1994). Actualmente existen test genéticos que nos ayudan a confirmar o excluir el diagnóstico de los síndromes hereditarios más importantes (Eng *et al.*, 2001).

Estos factores hereditarios también influyen en la edad de aparición del CC, así una persona con un familiar en primer grado con CC se estima que reduce en una media de 10 años la posible aparición de CC en comparación con las formas esporádicas de la enfermedad (Fuchs *et al.*, 1994).

Enfermedad inflamatoria intestinal

Se ha observado un mayor riesgo de CC en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, la duración y extensión de la enfermedad, así como la edad de comienzo, son factores que afectan al riesgo de desarrollar una displasia (Lewis *et al.*, 1999). En el caso de la colitis ulcerosa el riesgo aumenta de 5 a 15 veces en comparación con la población general (Karlen *et al.*, 1999) y en el caso de la enfermedad de Crohn hasta 20 veces más (Freeman, 2008).

Colecistectomía

La colecistectomía produce un flujo más continuo de bilis al duodeno y en consecuencia, un incremento de la degradación bacteriana dando lugar a ácidos biliares secundarios, los cuales han sido propuestos como carcinogénicos. Aunque numerosos estudios han subrayado la relación entre colecistectomía y cáncer de colon como el trabajo de Lagergren *et al.*, 2001, esta posible asociación no ha podido ser firmemente establecida o refutada aún.

3.2. CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

La forma de presentación del CC es muy variable, dependiendo de su localización a nivel de los distintos segmentos del colon y de las características de la propia lesión. Durante largos periodos de tiempo es silente, produciendo síntomas, en la mayoría de los casos, cuando el tumor está muy avanzado.

La analítica rutinaria en muchos casos es completamente normal. Se puede detectar la existencia de anemia y ferropenia (Annibale *et al.*, 2001). El origen digestivo se sospecha si se encuentra sangre oculta en heces. Los test de función hepática se encuentran alterados cuando existen metástasis hepáticas. Varios marcadores tumorales séricos se han asociado con cáncer colorrectal, sobre todo CEA (antígeno carcinoembrionario). Así, el rendimiento diagnóstico por datos moleculares es bajo debido a que puede encontrarse elevado en otras enfermedades benignas y a su baja sensibilidad en el estadio inicial de la enfermedad (Duffy *et al.*, 2003).

Sin embargo, sí se puede llegar a un diagnóstico de certeza mediante una combinación de datos clínicos y analíticos, así como la utilización de técnicas de imagen y de abordaje directo, que además, nos permite la toma de muestras para estudios histológicos. Las técnicas de las que se disponen y se manejan actualmente son:

- Sangre oculta en heces. Se utiliza sobre todo como método de despistaje en la población (Mandel *et al.*, 2000)
- Enema de bario con doble contraste. Es un método diagnóstico poco utilizado actualmente. Puede estar indicado en la búsqueda de zonas estenóticas (Rex, 2002)
- Colonoscopia. Nos permite valorar toda la mucosa colónica y la toma de biopsias (Rembacken *et al.*, 2000)
- Colonoscopia virtual. Permite obtener imágenes tomográficas, y su posterior reconstrucción por ordenador en dos o tres dimensiones (Pickhardt *et al.*, 2003)
- Ecoendoscopia. Se utiliza para evaluar la invasión del cáncer rectal (Norton y Thomas, 1999)

3.3. ESTADIO Y PRONÓSTICO

La supervivencia después de la resección quirúrgica depende fundamentalmente del estadio de la enfermedad. Aunque el estado ganglionar es el indicador pronóstico más importante, la profundidad de la invasión del tumor en la pared (T), así como el grado de diferenciación (Grinnell, 1939), afectación de vasos linfáticos (Minsky *et al.*, 1989), sanguíneos (Minsky *et al.*, 1988) e invasión perineural (Shirouzu *et al.*, 1993), también pueden influir en la supervivencia. Los sistemas de estadiaje valoran la afectación del tumor en el lugar primario, la afectación ganglionar regional y la metástasis a distancia. Existen diferentes sistemas de estadiaje, entre ellos, la clasificación de Dukes que aunque es válida en la actualidad, es imprecisa (Dukes, 1932). Por ello, el AJCC (del Inglés, American Joint Committee on Cancer) designó la clasificación TNM para clasificar el cáncer de colon. Este sistema describe la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cercanos (N) y la ausencia o presencia de metástasis distantes (M) (Edge *et al.*, 2010). Otros factores clinicopatológicos asociados con mal pronóstico no están recogidos en los sistemas de estadiaje.

4. ALTERACIONES MOLECULARES ASOCIADAS CON CÁNCER COLORRECTAL

La transformación de un epitelio normal en un carcinoma es un proceso complejo que surge de la interacción entre distintos factores ambientales y genéticos y que requiere de la acumulación de varias alteraciones en diferentes oncogenes, genes supresores y genes reparadores. Por este motivo, se admite que la formación de un tumor es un proceso en etapas. En el caso del cáncer colorrectal, Vogelstein y colaboradores establecieron un patrón de progresión (Vogelstein *et al.*, 1988; Vogelstein *et al.*, 1989) en base a una serie de alteraciones genéticas que eran las más claramente asociadas a los diferentes estadios (*APC*, *K-Ras*, *DCC*, *p53* y *NM23*).

La acumulación de alteraciones se puede producir por dos vías: inestabilidad cromosómica (CI, del Inglés Chromosomal Instability), que sucede en el 85% de los CC, e inestabilidad en microsatélites (MI, del Inglés Microsatellite Instability), en el 15% restante (Lengauer *et al.*, 1998; Lindblom, 2001).

La CI engloba alteraciones como cambios en el número de cromosomas o aneuploidías y pérdidas de material genético en los brazos cromosómicos que son detectadas a nivel molecular. La CI afecta a genes implicados en la proliferación y división celular como **oncogenes** (*K-Ras*, *N-Ras*, *c-myc*, *myb*, *her-2/neu*) y **genes supresores** (*APC*, *MCC*, *DCC*, *p53*, *nm23*).

Sin embargo, en las alteraciones producidas por MI no existen pérdidas de material genético. La MI es considerada un marcador de la presencia de anomalías en los **genes de reparación de los errores de replicación** debido a que las alteraciones se detectan a nivel molecular en unidades de ADN altamente repetidas a lo largo del genoma. Estas unidades se denominan microsatélites de ADN, siendo las alteraciones en ellas una característica intrínseca de la célula tumoral. Estas alteraciones tienen como consecuencia la perpetuación de mutaciones en otras regiones importantes que podrían desencadenar por sí mismas el desarrollo de un tumor.

Las nuevas técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular permiten profundizar en el conocimiento del fenotipo y del genotipo de las neoplasias, y su correlación con la evolución biológica. Así, la utilización de estas técnicas abre la posibilidad de identificar otros factores pronósticos de marcado carácter molecular.

Entre los cambios moleculares más frecuentes detectados en las células tumorales se encuentran los siguientes:

4.1. ONCOGENES

K-Ras

El gen *K-Ras* pertenece a una familia implicada en regulación de procesos de transducción de señales, a través de la membrana celular (Barbacid, 1987). Se encuentra mutado con alta frecuencia en fases tempranas de la tumorigénesis en CC. Se cree que está implicado en la progresión a adenoma intermedio debido a que solo el 10% de los adenomas tempranos presentan mutaciones en este oncogén frente a la mitad de los adenomas intermedios y tardíos (Fearon y Vogelstein, 1990; Shibata *et al.*, 1993). La mayoría de las mutaciones en este gen se localizan en el codón 12 y en menor proporción en los codones 13 y 61. Las mutaciones están asociadas con una

hiperactivación de la proteína y con un peor pronóstico clínico (Ahnen *et al.*, 1998; Sidransky *et al.*, 1992).

c-myc

Pertenece a la familia Myc y codifica una proteína nuclear implicada en la replicación de ADN. En gran número de cánceres humanos se ha encontrado una sobreexpresión asociada a tumores poco diferenciados y muy agresivos (Pelengaris y Khan, 2003). En tumores de colon esta sobreexpresión es debida principalmente a amplificación génica. Bajo condiciones normales, la proteína c-myc acelera el ciclo celular acortando la fase G1, y reduce o elimina el requerimiento de factores de crecimiento para la proliferación de ciertas líneas celulares.

Myb

Este gen codifica para un factor de transcripción implicado en regulación de la progresión del ciclo celular. Se ha encontrado sobreexpresado en cáncer de colon, de mama y otros tumores (Ramsay y Gonda, 2008).

her-2/neu

Codifica para una proteína tirosina-kinasa que funciona como receptor de la herregulina/NDF y de factores de crecimiento de células gliales llamados GGF (del Inglés, Glial Cell Growth Factors). Se encuentra amplificado en cáncer de colon. Además, se ha observado una relación con el estadio tumoral, siendo débil en los A y B de Dukes e intensa en los avanzados (Kapitanovic *et al.*, 1997).

4.2. GENES SUPRESORES

APC (del Inglés, Adenomatous Polyposis Coli)

Como ya se ha comentado, este gen fue identificado como el gen responsable del síndrome hereditario de poliposis adenomatosa familiar (Caspari *et al.*, 1994). Codifica una proteína implicada en apoptosis necesaria para la renovación del epitelio colónico, en funciones de adhesión celular y en procesos de regulación del ciclo celular, mediante la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb). Se han descrito numerosas alteraciones de este gen en las que la gran mayoría de ellas conducen a la formación de

una proteína truncada no funcional. La inactivación de un solo alelo del gen *APC* es suficiente para la aparición de pólipos adenomatosos en el colon, lo que sugiere que puede ser un evento temprano en el desarrollo de los cánceres esporádicos (Vogelstein *et al.*, 1989). En CC esporádicos y adenomas, incluyendo las lesiones displásicas más pequeñas, se han descrito mutaciones en *APC* entre el 60-80% de los casos (Fodde y Smits, 2001).

MCC (del Inglés, Mutated in Colorectal Cancer)

Se localiza en el cromosoma 5 muy próximo a *APC*. No se ha encontrado alterado en síndromes hereditarios pero sí existen diversos tipos de alteraciones en cánceres esporádicos de colon (Johnston *et al.*, 1995). Está implicado en la regulación negativa de NF κ B (del Inglés, Nuclear Factor- κ B) cuya ruta está implicada en la patología del cáncer colorrectal (Bouwmeester *et al.*, 2004). Recientemente, se ha observado su función en la inhibición de la vía Wnt a través de la interacción con β -catenina (Fukuyama *et al.*, 2008).

DCC (del Inglés, Deleted in Colorectal Cancer)

Se localiza en el brazo largo del cromosoma 18. Codifica para una proteína con regiones homólogas a las proteínas de adhesión celular. Se piensa que su inactivación contribuye a la invasividad y capacidad metastásica de las células tumorales. Se encuentra deletado en el 50% de los adenomas avanzados y en el 70% de los CC. Sin embargo, es poco común en adenomas intermedios y tempranos, por lo que se le ha relacionado con el avance de adenomas intermedios a tardíos (Vogelstein *et al.*, 1989). Inicialmente se pensaba que podía tener un papel más importante debido a la asociación entre pérdida en estadio B de Dukes y peor pronóstico, pero más recientemente no está tan claro su papel como gen supresor caracterizado (Carethers *et al.*, 1998).

p53

Es uno de los genes que más ampliamente se han estudiado debido a que se encuentra alterado en aproximadamente un 50% de los tumores humanos y en más del 80% en tumores colorrectales (Gerdes, 1991). Se cree que está implicado en el paso de adenomas a carcinomas, debido a que las alteraciones en adenomas son inexistentes (Vogelstein *et al.*, 1989). La proteína actúa como factor de transcripción de genes

implicados en el control del ciclo celular y en apoptosis asegurando la integridad del genoma celular, activándose tras daño en el ADN. La pérdida de función de p53 lleva a una mayor acumulación de mutaciones en otros genes, por lo que estos tumores suelen ser más agresivos.

NM23 (del Inglés, Non Metastatic clone 23)

Localizado en el cromosoma 17 codifica para una proteína con actividad kinasa. Su pérdida se ha asociado con una mayor capacidad metastásica de los tumores (Vogelstein *et al.*, 1989; Hartsough y Steeg, 2000).

4.3. GENES REPARADORES

Los genes reparadores principalmente relacionados con CC son: *hMSH2* (mutS homólogo humano 2), *hMLH1* (mutL homólogo humano 1), *hPMS1* y *hPMS2* (segregación postmeiótico humano 1 y 2), *hMSH6* (mutS homólogo humano 6), y *hMSH3* (mutS homólogo humano 3). Sus proteínas, junto con otras requeridas por el sistema de reparación, constituyen distintos heterodímeros formando complejos que reconocen los errores en el ADN y los corrigen (Muñoz, 1997).

La pérdida de función de estos genes reparadores provoca un incremento significativo de mutaciones en todo el genoma acelerando el proceso de tumorigénesis, que puede afectar a oncogenes y genes supresores, estimándose que durante el proceso de replicación la acumulación de mutaciones es del orden de 100 a 1000 veces mayor.

En el cáncer de colon hereditario no polipósico, *MLH1* se encuentra mutado en un 50% de los casos, *MSH2* en un 40%, *MSH6* en un 10% y *PMS2* en menos del 5% (Achary *et al.*, 1996). En el caso del CC esporádico, el porcentaje de alteraciones en estos genes es menor, siendo aproximadamente el 15%. Los tumores con inestabilidad de microsatélites se asocian con localización en el colon derecho y suelen ser de tipo mucinoso, con infiltrado inflamatorio y pobremente diferenciados (Smyrk, 1994).

5. EL MICROAMBIENTE TUMORAL

En los últimos años, el microambiente tumoral ha sido objeto de una intensa investigación, ya que las alteraciones que se producen en el estroma que rodea el tumor

pueden resultar útiles en el pronóstico y generar nuevas dianas terapéuticas. Sin embargo, la importancia del microambiente no es un concepto nuevo. La idea de que las células estromales pueden promover el desarrollo del cáncer fue reconocida por primera vez en 1863, cuando Rudolph Virchow observó leucocitos en el estroma del tejido neoplásico y planteó que el cáncer se podía originar en lugares de inflamación crónica (Balkwill y Mantovani, 2001). Éste se centró sólo en la inflamación y no consideró el papel de otros elementos del estroma, no obstante, en 1889, Paget presentó su hipótesis "*seed and soil*" donde ya se abarcaban todos los componentes del microambiente (Paget, 1889). En 1982, Bissell *et al* describieron por primera vez la teoría moderna que propone que el microambiente en el cual se desarrollan las células tumorales es tan fundamental para su evolución como las mutaciones genéticas que en ellas se produzcan (Bissell *et al.*, 1982). Así, en las últimas décadas se ha asentado la idea que revela que los tumores no son masas aisladas de células tumorales que proliferan sino que son complejos tejidos compuestos por distintos tipos celulares que participan en interacciones heterotípicas entre sí. De manera que las células normales que forman el estroma asociado al tumor son participantes activos en la tumorigénesis favoreciendo el desarrollo y la ganancia de ciertas capacidades tumorales. Por lo tanto, la biología de los tumores no puede entenderse simplemente enumerando las características de las células tumorales sino que debe considerarse también la contribución del microambiente tumoral (Hanahan y Weingber, 2011).

5.1. COMPONENTES

El microambiente tumoral está compuesto por varios tipos celulares independientes como son los fibroblastos asociados al tumor, las células endoteliales y linfáticas, los pericitos, las células inmunes y las células derivadas de la médula ósea, además de la matriz extracelular en la que se embeben todas las células (Augsten *et al.*, 2010; Worthley *et al.*, 2010) (Figura 2). En este complejo escenario, tienen lugar una gran variedad de interacciones entre sus diversos componentes que determinan una serie de eventos, tales como la proliferación celular tumoral, el potencial metastásico y la localización de las metástasis (Bissell y Radisky, 2001, Li *et al.*, 2007).

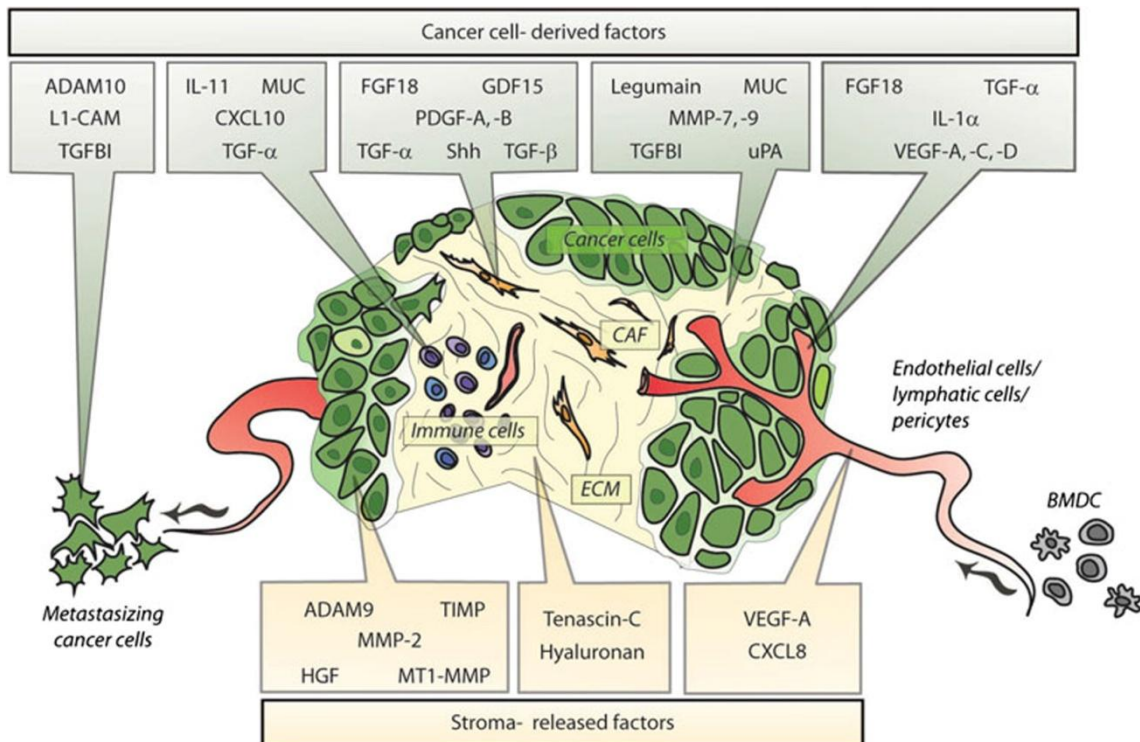


Figura 2. El microambiente tumoral: componentes y moléculas implicadas en la comunicación entre las células tumorales y estromales (Augsten *et al.*, 2010).

5.1.1. FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL TUMOR

Los fibroblastos son uno de los tipos de células más activos del estroma (Xouri y Christian, 2010). Están presentes en el estroma de los tejidos normales, donde realizan las funciones de reparación de tejidos bajo ciertas condiciones fisiológicas, y en el estroma de los tumores, en el que representan el componente principal (Räsänen y Vaheri, 2010). Estos fibroblastos han recibido varios nombres: fibroblastos asociados a tumores, fibroblastos asociados a carcinoma (del Inglés, Cancer Associated Fibroblasts, CAF) o miofibroblastos (Beacham y Cukierman, 2005). Son similares a los que se encuentran en el proceso de curación de heridas, aunque en los procesos tumorales, los fibroblastos están constantemente activados.

Los fibroblastos activados se caracterizan molecularmente por la expresión de varios marcadores. Algunos de los marcadores de CAF más comunes son α -SMA (del Inglés, α -Smooth Muscle Actin), FSP1 (del Inglés, Fibroblast-Specific Protein 1) también conocido como S100A4 y FAP (del Inglés, Fibroblast Activation Protein) (Xouri y Christian, 2010; Räsänen y Vaheri, 2010). Se ha sugerido que individualmente estos marcadores pueden identificar subpoblaciones específicas de fibroblastos, pero que sería

más apropiado la utilización de varios marcadores para seleccionar la mayor población posible de fibroblastos asociados a tumores (Sugimoto *et al.*, 2006).

Los fibroblastos asociados a tumores pueden promover el crecimiento y progresión del tumor, favoreciendo una variedad específica de mecanismos tumorales (Orimo y Weinberg, 2006) que influyen en el comportamiento de los tumores y el pronóstico de los pacientes (Gout y Huot, 2008). De esta forma, los CAF se han visto implicados en la remodelación de la matriz extracelular (Beacham y Cukierman, 2005; Calvo *et al.*, 2013), la liberación de factores solubles, la regulación de la migración e invasión de células tumorales y la formación de la metástasis (Sugimoto *et al.*, 2006; Orimo y Weinberg, 2006; Gout y Huot, 2008; De Wever *et al.*, 2014). Además, intervienen en la modulación de la respuesta inmune (Harper y Sainson, 2014), el metabolismo del tumor (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2014) promueven la angiogenesis (Orimo *et al.*, 2005) y favorecen el mantenimiento de la pluripotencialidad y la resistencia a drogas (Chen *et al.*, 2014; Kinugasa *et al.*, 2014).

- **Origen**

Los CAF son poblaciones celulares heterogéneas y su composición relativa difiere en gran medida entre los diferentes tumores, dentro de un determinado tipo de tumor e incluso entre los tumores individuales (Worthley *et al.*, 2010). Esta amplia heterogeneidad en los CAF podría ser explicada por su origen diverso. Así, se ha descrito que los CAF pueden derivar de fibroblastos residentes, de células progenitoras derivadas de la médula ósea, de células endoteliales o cancerosas a través de transición endotelio/epitelio-mesénquima y también de otros tipos de células incluyendo las células de músculo liso, pericitos, adipocitos o células inflamatorias (Allen y Louise, 2011).

- **Alteraciones genéticas**

En las últimas décadas, distintos trabajos han descrito alteraciones clonales somáticas en los CAF. Estudios en tumores de mama usando microdissección láser, determinaron que las mutaciones en los fibroblastos del estroma se asociaban mejor con el pronóstico de los pacientes, que los cambios genéticos en las células epiteliales tumorales (Fukino *et al.*, 2007; Patocs *et al.*, 2007). En el caso de tumores de colon, también se han

descrito diferencias en la inestabilidad de microsatélites entre los compartimentos epitelial y estromal de los tumores sugiriendo una vía alternativa de la carcinogénesis que implica la inestabilidad genética del estroma (Matsumoto *et al.*, 2003). No obstante, estudios recientes han demostrado que los resultados obtenidos en estos trabajos se debían a artefactos por problemas metodológicos con el uso de muestras de ADN de baja calidad o cantidad; aunque, la ausencia de alteraciones genéticas no excluye la posibilidad de la existencia de otros mecanismos como los cambios epigenéticos que pueden estar contribuyendo al mantenimiento del fenotipo CAF (Campbell *et al.*, 2011).

- **Interacción con otros tipos celulares**

Los fibroblastos liberan distintos factores de crecimiento como VEGF (del Inglés, Vascular Endotelial Growth Factor), FGF (del Inglés, Fibroblast Growth Factor), HGF (del Inglés, Hepatocyte Growth Factor), TGF- β (del Inglés, Transforming Growth Factor b), EGF (del Inglés, Epithelial Growth Factor) o IGF (del Inglés, Insuline Growth Factor) que favorecen el reclutamiento de distintos tipos celulares como las células del sistema inmune y las células endoteliales (Ostman y Augsten, 2009). Además, muchos tipos celulares epiteliales expresan los receptores para algunos de estos factores de crecimiento, y así los fibroblastos pueden incrementar la proliferación de las células epiteliales tumorales (Bhowmick *et al.*, 2004; Ostman y Augsten, 2009).

En un modelo de cáncer de mama en el que se co-inyectaron CAF humanos con células tumorales, se observó que los CAF incrementaban el crecimiento tumoral en comparación con los fibroblastos normales y que estimulaban la angiogénesis secretando la quimioquina SDF1 que recluta células precursoras de endoteliales (Orimo *et al.*, 2005). En cáncer de cérvix se determinó que FGF liberado por los fibroblastos inducía angiogénesis (Pietras *et al.*, 2008). En tumores de próstata se observó que la sobre-expresión de CXCL12 en los CAF al co-inyectarlos con células tumorales poco tumorogénicas, aumentaba el crecimiento tumoral y la infiltración de macrófagos (Augsten *et al.*, 2009).

Los fibroblastos también se han visto implicados en la metástasis de las células tumorales favoreciendo la degradación de la matriz extracelular, facilitando la invasión y la migración de las células tumorales (Kalluri y Zeisberg, 2006). Así, en modelos de

cáncer de colon se ha visto que la expresión de STC1 en fibroblastos potencia la aparición de metástasis distales (Peña *et al.*, 2013).

5.1.2. CÉLULAS INMUNES: EL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO

Los estados inflamatorios se asocian con un aumento de riesgo en el desarrollo y la progresión de los cánceres (Qian y Pollard, 2010). De hecho, recientemente se ha propuesto la inflamación como una de las características definitorias del cáncer (Hanahan y Weinberg 2011; Colotta, 2009). La respuesta inflamatoria que tiene lugar durante los procesos tumorales produce el reclutamiento de varios tipos de células inmunes como leucocitos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos (Coussens y Werb, 2002; Mantovani *et al.*, 2008; Joyce y Pollard, 2009). De todos ellos, es en los macrófagos en los que más se ha estudiado los efectos pro-tumorigénicos.

- Poblaciones de macrófagos

Se han descrito dos tipos de poblaciones de macrófagos: los macrófagos activados clásicamente (M1) y los macrófagos activados alternativamente (M2) (Murray y Wynn, 2011).

Los **macrófagos M1** pueden inducirse mediante estimulación con interferón- γ (IFN- γ) solo o con otras moléculas, como lipopolisacárido (LPS) o citoquinas (por ejemplo, TNF- α , del Inglés Tumor Necrosis Factor- α) (Mantovani *et al.*, 2002). Estas células secretan altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, e IL-23 y producen especies reactivas al oxígeno y radicales de nitrógeno (Fairweather y Cihakova, 2009; Sindrilaru *et al.*, 2011). Además, expresan altos niveles de MHC I/II, y secretan factores del complemento que facilitan la fagocitosis mediada por éste (Mantovani *et al.*, 2004). También pueden secretar altos niveles de la sintasa inducible por óxido nítrico (iNOS) para promover la metabolización de la arginina en óxido nítrico y citrulina (Modolell *et al.*, 1995). Así, estas células desarrollan una respuesta antitumoral mediante la activación del sistema inmune (Allavena *et al.*, 2008).

Los **macrófagos M2** pueden polarizarse por estímulos diferentes y en consecuencia se subdividen en M2a, M2b y M2c. Los macrófagos M2a pueden inducirse por las citoquinas IL-4 o IL-13, mientras que los macrófagos M2b pueden ser estimulados por complejos inmunes, LPS, TLRs, o IL-1ra. Por último, los macrófagos M2c se inducen

por IL-10, TGF- β o glucocorticoides (Martinez *et al.*, 2010). Los macrófagos M2 expresan el receptor scavenger (SR), IL-10, el receptor de manosa (Sindrilaru *et al.*, 2011). De este modo, los macrófagos M2 llevan a cabo las funciones inmunosupresoras promoviendo la tumorigénesis (Allavena *et al.*, 2008). Además, también favorecen el proceso metastásico mediante la promoción de la angiogénesis y la degradación de la matriz extracelular (Mantovani *et al.*, 2008).

- **Papel de los macrófagos asociados a tumores**

Los macrófagos asociados a tumores exhiben un fenotipo M2 caracterizado por la expresión de una serie de marcadores, como CD163, el fragmento Fc de la IgG, los dominios de lectina de tipo C, chaperonas o DCSIGN (Biswas *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2008; Beck *et al.*, 2009; Domínguez-Soto *et al.*, 2011). Por otro lado, el microambiente del tumor contiene un conjunto de factores como IL-4, IL-13, TGF- β , e IL-10, que inducen un fenotipo de tipo M2 (Sica *et al.*, 2002). Existe controversia en relación a su función en los tumores ya que se ha descrito que en los tumores colorrectales los macrófagos del tumor son pro-inflamatorios, y desempeñan un papel antitumoral, lo que conduce a un buen pronóstico (Dumont *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2012). Pero sin embargo, en la mayoría de los tumores como mama, próstata, ovario, cérvix, pulmón, y melanoma cutáneo, se considera que los macrófagos son anti-inflamatorios y correlacionan con un mal pronóstico (Salvesen y Akslen, 1999; Ono *et al.*, 1999; Leek *et al.*, 1996). Además, los estudios epidemiológicos han sugerido que un microambiente rico en macrófagos promueve la agresividad tumoral y el potencial metastásico (Nardin y Abastado, 2008). Puede que esta aparente contradicción sea esclarecida con estudios que analicen marcadores específicos de M1 y M2.

5.1.3. OTROS COMPONENTES

- **Células endoteliales y pericitos**

Las células endoteliales constituyen los vasos sanguíneos necesarios para proveer al tumor de oxígeno y nutrientes y para eliminar los productos de desecho. Al mismo tiempo, la vasculatura tumoral es la mejor ruta para la dispersión de las células metastásicas a partir del tumor primario. En los tumores, los vasos sanguíneos tienen una morfología diferente a la de los vasos normales, formando una estructura irregular,

caótica (Bergers y Benjamin, 2003; Ruoslahti, 2002). Existen distintos factores implicados en la inducción, la estabilización, la migración y la ramificación de los vasos que se forman en el tumor, como VEGF, FGF o CXCL8 que estimulan la angiogénesis actuando directamente sobre las células endoteliales. Otras proteínas importantes en la formación de los vasos son angiopoyetina-1 (Ang-1), Dll4 y los miembros de la familia efrinas, así como TGF- β (Shibuya, 2008).

Los pericitos son reclutados en la pared de los vasos sanguíneos en respuesta a factores derivados de las células endoteliales como PDGF o TGF- β , y afectan a la estabilidad y la funcionalidad de los vasos. En los tumores, los pericitos están menos adheridos a los vasos, tienen una morfología diferente y expresan marcadores distintos a los pericitos de los vasos normales (Morikawa *et al.*, 2002). Además, son menos abundantes, lo que puede contribuir a la permeabilidad de la vasculatura tumoral. Algunos datos experimentales han mostrado que el aumento de pericitos puede mejorar el crecimiento del tumor (Furuhashi *et al.*, 2004; Abramsson *et al.*, 2003) aunque también puede representar una barrera para la metástasis (Xian *et al.*, 2006). El análisis de distintos marcadores parece indicar que existen distintos tipos de pericitos, y esto puede traer consigo diferencias en la sensibilidad a agentes que tienen como diana el receptor de PDGF, presente en dichos pericitos (Song *et al.*, 2005; Hasumi *et al.*, 2007). Aunque algunos estudios han demostrado que la reducción de la cubierta de pericitos se correlaciona con metástasis y con mal pronóstico, su potencial importancia pronóstica está poco estudiada (Yonenaga *et al.*, 2005).

- **La matriz extracelular**

La matriz extracelular es una red compleja de macromoléculas (colágenos, lamininas, fibronectinas, proteoglicanos y ácido hialurónico) que afecta tanto a las células tumorales promoviendo la transformación celular y la metástasis, como a las células del estroma, facilitando la angiogénesis y la inflamación asociada al tumor (Augsten *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012). Tiene distintas funciones como el anclaje de las células a la membrana basal, el mantenimiento de la polaridad tisular y la división celular asimétrica de células madre. También influye en la migración celular y en la comunicación celular ya que constituye un reservorio de moléculas de señalización, factores de crecimiento y de fragmentos de proteínas funcionales activos que son procesados por proteasas como las metaloproteasas (MMP). Por último, las células

detectan directamente las propiedades biomecánicas de la matriz extracelular, como su rigidez, lo que afecta a una amplia variedad de comportamientos como la diferenciación celular o la funcionalidad del tejido (Lu *et al.*, 2012).

5.2. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE PROMOTORES DE TUMOROGÉNESIS

Como ya ha sido comentado anteriormente, en la actualidad está establecido que las células del microambiente tumoral proporcionan a las células malignas un conjunto de factores de crecimiento, quimioquinas y ligandos de integrinas que estimulan la proliferación, la migración y la invasión. Asimismo, también se ha descrito que las células estromales representan una fuente importante de factores pro-angiogénicos. Por último, recientemente se ha determinado que el estroma tumoral tiene un papel fundamental en la capacidad de amortiguación de la acidificación del medio tumoral, así como en la influencia en la captación y sensibilidad de fármacos antitumorogénicos.

- Inducción de la proliferación, migración, invasión y angiogénesis

Los diferentes tipos de células en el microambiente son estimuladas por factores liberados por las células tumorales como TGF- β , EGF, TGF- α , PDGF, FGF, IGFs, shh y MMPs (Kitadai *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2008; De Wever *et al.*, 2004b; Kuwai *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2007; Sonvilla *et al.*, 2008; Varro *et al.*, 2007). A su vez, las células estromales responden mediante la producción de factores de crecimiento (por ejemplo, HGF, EGF, VEGF-A, bFGF), quimioquinas (como, CXCL-8; CXCL-12), citoquinas (por ejemplo, IL-6, IL-11), proteasas (como, ADAM9; MMP, MT-MMP, legumain) y moléculas de adhesión como la integrina 4 (Koshida *et al.*, 2006; Powell y Mifflin, 1999; Guo *et al.*, 2008; Heidemann *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2007). Estas moléculas crean así una comunicación intercelular induciendo la angiogénesis y la proliferación de las células tumorales. Además, protegen de la muerte celular, favoreciendo el crecimiento independiente de sustrato de las células tumorales y contribuyen a la remodelación de la matriz extracelular. También median el reclutamiento de células inflamatorias y precursoras, inducen la transición epitelio-mesénquima y estimulan la invasión y la metástasis de las células tumorales (Koyama, 2005; Mazzocca *et al.*, 2005; Sugiyama *et al.*, 2005; Doucas *et al.*, 2005; Klapholz-Brown *et al.*, 2007; De Wever *et al.*, 2004a). Del mismo modo, el crecimiento de los tumores metastásicos se sostiene

por el microambiente. Por ejemplo, los CAF de las metástasis hepáticas de colon expresan factores estimuladores del crecimiento de las células tumorales como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y TGF- β 2 (Nakagawa *et al.*, 2004).

- **Amortiguamiento de la acidificación del medio tumoral**

Durante la tumorigénesis, el crecimiento acelerado de las células tumorales lleva a la formación de un microambiente hipóxico que induce la formación de vasos en el tumor al mismo tiempo que fuerza a las células tumorales al uso de vías metabólicas anaeróbicas con la consecuente creación de un microambiente ácido.

Un estudio realizado por Koukourakis *et al.* (2006) demostró que los CAF muestran una expresión alta de múltiples proteínas implicadas en la amortiguación del medio ácido producido por las células malignas. Además, las células estromales utilizan vías metabólicas alternativas y por lo tanto contribuyen a la formación de un "dominio metabólico colaborador". Curiosamente, estas diferencias metabólicas ocurren a la vez con perfiles de señalización similares entre las células de cáncer de colon y las células del estroma (Sheehan *et al.*, 2008).

- **Contribución a la Transición Eitelio Mesénquima**

Una característica que se observa con frecuencia en CC y otros tipos de cáncer es la Transición Eitelio Mesénquima (TEM) que contribuye a la invasión de los tejidos adyacentes de las células tumorales. La característica más típica de este proceso es la reducción de la proteína E-cadherina en las células tumorales, debida a la sobre-expresión de varios factores de transcripción que la reprimen promoviendo la TEM, como Snail1, Slug, TWIST o ZEB1 (Peinado *et al.*, 2007). Paralelamente, casi todos los tumores de colon poseen la vía de señalización de β -catenina desregulada, observándose la acumulación de esta proteína en el núcleo de las células tumorales (Doucas *et al.*, 2005; Segditsas y Tomlinson, 2006). La detección del fenotipo TEM o la acumulación nuclear de β -catenina se observa con frecuencia en diferentes carcinomas, particularmente en el frente invasivo donde las células del estroma y las células del parénquima interactúan sugiriendo una participación activa del estroma en estos procesos (Kirchner y Brabletz, 2000; Gunji *et al.*, 1998).

Hoy en día, existen notables evidencias de que el microambiente es un factor clave en la estimulación de la TEM favoreciendo así las propiedades invasivas de los tumores. Así, el microambiente participa en la activación de varias vías de señalización que controlan la TEM, como son las tirosinas quinasas, integrinas, Wnt/ β -catenina y TGF- β (Huang y Du, 2008). La inhibición de fosfatasa como SHP2, LAR y PTEN está asociada a la estimulación de la TEM mediada por TGF- β (Giehl y Menke, 2008). También, muchos factores derivados de células inflamatorias se han relacionado con la TEM a través de mecanismos que implican la estabilización o la activación de NF- κ B y COX2 (Wu *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2004; Katoh y Katoh, 2009; Castellone *et al.*, 2005).

- **Influencia en la captación y en la sensibilidad de fármacos**

Estudios recientes han demostrado que el estroma tumoral influye en la absorción de fármacos afectando también a la sensibilidad intrínseca que las células malignas tienen a los mismos (Meads *et al.*, 2009). Así, el microambiente tumoral afecta a la sensibilidad de drogas a través de la producción de factores paracrinós, así como de la modulación de la adhesión celular de las células tumorales a la matriz extracelular.

La composición y las propiedades físicas del microambiente tumoral pueden limitar la absorción de drogas, por ejemplo, a través de un aumento de la presión del fluido intersticial o mediante una vascularización disfuncional (Heldin *et al.*, 2004). Se ha confirmado mediante estudios experimentales que la normalización de la vasculatura del tumor así como la reducción de la presión del fluido intersticial mejoran la administración de fármacos (Tong *et al.*, 2004; Wildiers *et al.*, 2003; Willett *et al.*, 2004; Pietras *et al.*, 2002; Pietras *et al.*, 2001). Igualmente, se ha demostrado que inhibiendo la vía de señalización estromal “Hedgehog” se puede mejorar la absorción de gemcitabina en un modelo de ratón dependiente de Ras en cáncer de páncreas (Olive *et al.*, 2009).

5.3. EL MICROAMBIENTE COMO NUEVA DIANA TERAPÉUTICA

El microambiente tumoral representa una importante diana terapéutica ya que, como se ha comentado anteriormente, tiene un papel esencial en la estimulación del crecimiento y la progresión del tumor, además de estar implicado en la absorción y sensibilidad de fármacos. También, los datos derivados del análisis del tejido tumoral humano

demuestran la relevancia en el pronóstico de los marcadores del estroma, apoyando su valor clínico en esta enfermedad (Tammi *et al.*, 2008; Tutton *et al.*, 2003; Ngan *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2004; Degen *et al.*, 2008).

- Drogas aprobadas dirigidas al microambiente tumoral

Actualmente, existen unos 15 medicamentos dirigidos más o menos específicamente a factores de crecimiento, sus receptores o moléculas de señalización relacionados con el microambiente tumoral.

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF impidiendo la señalización de su receptor. Su uso está aprobado para muchos tumores sólidos, incluyendo cáncer colorrectal, en base a una serie de estudios en fase III (Hurwitz *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2007; Sandler *et al.*, 2006). Sorafenib y sunitinib pertenecen al grupo de inhibidores multi-quinasas y ambos han demostrado su eficacia, por ejemplo en estudios de fase III de cáncer renal (Escudier *et al.*, 2007; Motzer *et al.*, 2007). Estos medicamentos bloquean múltiples quinasas incluyendo receptores de PDGF y de VEGF. Es probable que el bloqueo de estos receptores, que se expresan predominantemente en CAF y en células endoteliales y pericitos, respectivamente, contribuya a los efectos terapéuticos de estos medicamentos. Por último, Everolimus y Temsirolimus son dos inhibidores de mTOR que han demostrado su eficacia en los estudios de fase III (Hudes *et al.*, 2007; Motzer y Basch E, 2007).

- Enfoques experimentales dirigidos a los CAF

Las evidencias de que los CAF contribuyen de manera crítica al crecimiento y progresión del tumor, ha impulsado el desarrollo de estudios que tienen como diana factores implicados en el crecimiento y activación de los CAF. Así, los estudios con diferentes tipos de inhibidores de PDGF han demostrado sus efectos antitumorales en un modelo ortotópico de CC y en un modelo genético de cáncer cervical asociado a VPH (Kitadai *et al.*, 2006; Pietras *et al.*, 2008). También se han observado potentes efectos anti-tumorales mediante la inhibición de la señalización Hedgehog en fibroblastos de tumores experimentales, incluyendo modelos de CC (Yauch *et al.*, 2008).

- **Pro-drogas experimentales impermeables a las células**

El desarrollo de pro-drogas impermeables a las células es un enfoque novedoso basado en el enriquecimiento de ciertas proteasas en el microambiente tumoral en comparación con el tejido normal. Los péptidos quimioterapéuticos son procesados y liberados tras su escisión proteolítica y actúan en el tumor y en las células del estroma. Es importante destacar que la expresión específica de proteasas en el tumor disminuye la toxicidad inducida por el fármaco en otros tejidos.

La doxorubicina es un ejemplo de este tipo de pro-drogas que actúa tras ser procesada por la proteasa legumain, secretada por los macrófagos asociados al tumor y las células endoteliales. Esta pro-droga tiene potentes efectos anti-tumorales en modelos de xenoinjertos en los cuales posiblemente sea activada debido a la infiltración de macrófagos o neutrófilos (Juan *et al.*, 2009).

- **Inmunoterapia experimental**

La estimulación del sistema inmune del huésped frente a los tumores ya sea por aumento de las células T CD8 positivas o la activación de células T CD4 positivas se ha demostrado que es otro prometedor enfoque terapéutico, al menos en estudios animales. Así, la inyección intratumoral de un vector adenoviral que expresa CCL17 induce el reclutamiento de macrófagos y de células T CD8 positivas, ralentizando el crecimiento tumoral en un modelo murino de carcinoma de colon (Kanagawa *et al.*, 2007).

En modelos animales, Loeffler *et al.*, generaron una vacuna dirigida contra la proteína de activación de fibroblastos (FAP), que se encuentra sobreexpresada en CAF, consiguiendo así la supresión del crecimiento de células de cáncer de colon y mejorando la absorción de las drogas en los xenoinjertos (Loeffler *et al.*, 2006). Un enfoque similar utilizando una vacuna de ADN contra el receptor- β de PDGF mostró también efectos anti-tumorales mediante la interferencia de los pericitos y por tanto de la angiogénesis (Kaplan *et al.*, 2006).

Al mismo tiempo, la inmunoterapia dirigida contra componentes abundantes de la matriz extracelular como MUC1 también ha demostrado ser efectiva en la supresión del crecimiento tumoral ortotópico y metastásico (Sugiura *et al.*, 2008).

Finalmente, la experiencia clínica y los estudios experimentales demuestran de manera convincente el beneficio de la combinación de tratamientos. Las drogas dirigidas contra el microambiente, probablemente tengan mejores efectos en combinación con otros medicamentos. Varios estudios experimentales realizados en modelos de cáncer gastrointestinal y en otros tumores apoyan esta idea (Yokoi *et al.*, 2005; Juan *et al.*, 2009; Kitadai *et al.*, 2006; Blansfield *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Este trabajo consta de dos fases, en las que se analizan diferentes marcadores estromales conocidos y se determinan otros nuevos en relación a sus características funcionales y a su capacidad informativa para identificar diferentes riesgos en pacientes con CC. Ambas serán realizadas mediante los siguientes objetivos:

I. El primer objetivo principal se centra en el estudio de marcadores representativos de estroma activado, en fibroblastos asociados a tumores y macrófagos M2, en carcinomas colorrectales y sus capacidades para identificar grupos de pacientes con diferente evolución. Los objetivos secundarios a desarrollar son:

- Estudio de los niveles de ARNm y proteína de los marcadores de CAF, α -SMA, FSP1 y FAP, y de los de macrófagos M2, DCSIGN y CD163, en las muestras de tejido tumoral y normal de una serie de pacientes con carcinomas de colon.
- Análisis de la asociación entre los niveles de expresión de estos genes de estroma activado seleccionados y parámetros de agresividad histológica de los tumores.
- Estudio de la capacidad de estos marcadores específicos de estroma activado, en base a la asociación de sus niveles de expresión con la supervivencia libre de enfermedad y global, para ofrecer información pronóstica de los pacientes.

II. El segundo objetivo analiza características funcionales de fibroblastos primarios asociados a tumores, e investiga la presencia de factores moleculares con valor positivo aplicable en pacientes con cáncer colorrectal:

- Puesta a punto de la metodología para el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores de colon humanos y de fibroblastos procedentes de mucosa colónica normal.
- Categorización de los cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores en función de sus capacidades para estimular la migración de líneas celulares tumorales de colon. Comparación de las capacidades pro-migratorias de los

distintos cultivos de fibroblastos asociados a tumores en relación a los fibroblastos normales.

- Estudio de las características de activación de los cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores y asociación de éstas con propiedades pro-migratorias.
- Clasificación de los cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores en función de sus propiedades de pluripotencia y asociación de éstas con propiedades pro-migratorias.
- Análisis del perfil génico de los distintos tipos de cultivos de fibroblastos en relación a sus capacidades de estimular la migración de células tumorales de colon considerando como valor de referencia los cultivos de fibroblastos normales.
- Determinación de una firma de expresión génica de los CAF más pro-migratorios respecto a los menos pro-migratorios capaz de identificar aquellos pacientes con un estroma más pro-tumorigénico.
- Evaluación *in silico* del valor predictivo de la firma de expresión génica de fibroblastos asociados a tumores en pacientes con cáncer de colon.
- Validación de estas características con aplicabilidad clínica de varios genes de la firma génica previa de fibroblastos asociados a tumores en una serie externa de pacientes.

METODOLOGÍA

1. PACIENTES Y MUESTRAS HUMANAS

Este estudio ha sido diseñado y realizado en el Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda con la colaboración del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, cuyos respectivos Comités de Ética e Investigación Clínica lo han considerado éticamente correcto y preceptivamente aprobado. Todos los pacientes estudiados eran considerados representantes de la forma esporádica de cáncer de colon, ya que aquellos que pertenecían a familias con poliposis adenomatosa familiar o cáncer de colon hereditario no polipósico, según los criterios de Amsterdam, fueron excluidos. Se utilizó un número diferente de casos para cada uno de los estudios que conforman este trabajo, así:

- En el estudio del valor pronóstico de marcadores estromales relevantes, se analizaron muestras de 289 pacientes operados de cáncer de colon entre los años 2002 y 2006. Las muestras de tejido tumoral y de mucosa colónica normal (tomada al menos a 3 cm del tumor) fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido desde el momento de la cirugía y permanecieron conservadas a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

- Para el estudio de nuevos marcadores estromales en fibroblastos asociados a tumores, se reclutaron muestras de tejido tumoral y mucosa normal en fresco de 21 pacientes para el establecimiento de los cultivos primarios de CAF y fibroblastos normales (FN). Además, se emplearon 142 muestras de tejido tumoral de la serie de pacientes con cáncer de colon referida anteriormente.

Todas las muestras fueron examinadas por dos patólogos para establecer el diagnóstico de adenocarcinoma, elaborar el estadio patológico, y ratificar ausencia de células tumorales en el tejido normal.

Se revisaron las historias clínicas de cada uno de los 310 pacientes para determinar su sexo y fecha de nacimiento, así como cada uno de los siguientes parámetros patológicos:

- tamaño del tumor
- localización del tumor
- afectación ganglionar
- estadio

- invasión vascular
- diferenciación tumoral
- presencia de pólipos en la pieza quirúrgica

El estadio fue elaborado según la clasificación TNM que valora la afectación del tumor en el lugar primario (T), la afectación ganglionar regional (N) y la presencia de metástasis a distancia (M).

El grado de diferenciación fue realizado de acuerdo con el porcentaje de aparición glandular en el tumor, distinguiéndose en tumores bien, moderados y poco diferenciados.

La supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) se definieron como el periodo de tiempo desde el diagnóstico hasta la muerte y el periodo de tiempo desde el diagnóstico hasta la primera recurrencia, respectivamente.

2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS

El establecimiento de los cultivos primarios de fibroblastos se realizó a partir de explantes de tejido fresco de los pacientes. Las muestras de tejido normal y tumoral se cortaron en pequeñas piezas (2-3 mm³) y se sembraron en FBS (Fetal Bovine Serum; Invitrogen) suplementado con penicilina (200 U/ml), estreptomicina (200 µg/ml), anfotericina B (2,5 µg/ml) y gentamicina (100 µg/ml). Cuando se observó el crecimiento de los fibroblastos, el medio de crecimiento se reemplazó por medio de cultivo FBM (Fibroblast Basal Medium; Lonza) suplementado con FGM-2 Bulletkit (Lonza) para facilitar el crecimiento celular. Se descartó el tejido remanente y los fibroblastos primarios normales y tumorales se mantuvieron de manera rutinaria con medio de cultivo FBM a una temperatura de 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

El mantenimiento de los cultivos se realizó en un ratio de 1 a 2 tal como recomienda la ATCC Cell Culture Technical Resource (www.atcc.org), por lo tanto, el número de pases es igual al número de duplicaciones celulares. Todos los experimentos del estudio se realizaron con CAF o FN con un máximo de 7 pases, siendo excluidos aquellos cultivos que entraron en senescencia.

3. EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS MUESTRAS Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA

a. Procedimiento

Se utilizaron protocolos diferentes en función del estudio:

- Para la extracción de ARN total del tejido crioconservado se usó el kit de extracción de ARN “Rneasy Mini Kit” (Qiagen, Inc., Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon aproximadamente 30 mg de cada muestra de tejido normal y tumoral de cada paciente que fueron disgregadas mecánicamente y homogenizadas siguiendo las instrucciones del MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

- La extracción de ARN total de las muestras de los fibroblastos primarios se realizó añadiendo directamente el reactivo TRIsure (Bioline) en las placas de cultivo y continuando el procedimiento con fenol/cloroformo según recomienda el protocolo del fabricante.

b. Cuantificación de las extracciones

Las concentraciones de ARN de cada extracción de las muestras fueron calculadas midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc.). De cada una de las muestras se prepararon diluciones de 100 ng/μl de ARN, las cuales fueron posteriormente usadas en las reacciones de RT-PCR. El ratio de las absorbancias 260 nm/280 nm oscilaba en todas las muestras de tejido utilizadas entre 1.6 y 1.8, el cual es considerado óptimo para muestras diluidas en agua.

c. Transcripción Reversa

El ARN total de cada muestra fue retrotranscrito a ADNc mediante el kit GeneAmp Gold PCR core Kit (PE Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante, utilizando 400 μg de ARN de cada muestra para la reacción de retrotranscripción. Durante el proceso, las muestras se sometieron a un ciclo de 10 minutos a 25 °C seguido de otro ciclo de 12 minutos a 42 °C lo cual dio lugar a la

síntesis de ADNc, que posteriormente fue amplificado mediante una reacción de PCR a tiempo real.

4. CUANTIFICACIÓN A TIEMPO REAL (Real Time PCR)

Se usó la media geométrica de dos genes de referencia, SDHA (Subunidad A del complejo Succinato Deshidrogenasa) y UBC (Ubiquitina C) para la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés, como fue descrito por Vandesompele *et al* (Vandesompele *et al*, 2002). Los cebadores utilizados, descritos en la Tabla 1, 2, 3 y 4, fueron diseñados específicamente situando un intron entre el cebador directo y el reverso para evitar posibles contaminaciones con ADN. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Light-Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) con el kit LightCycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

El proceso consta de un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos. A continuación entre 35 y 45 ciclos los cuales contenían a su vez, un paso de desnaturalización de 2 segundos a 95 °C, un paso de anillamiento de cebadores durante 5 segundos y un último paso de elongación a 72 °C durante otros 6 segundos al final de los cuales se realizaba la adquisición de fluorescencia. Por último, las curvas de melting de los productos de PCR, temperatura a la que se encuentran desnaturalizadas la mitad de las bases de un amplicón específico, eran analizadas para verificar la reacción de PCR y los productos amplificados eran secuenciados mediante un secuenciador ABI Prism 377 DNA (PE Applied Biosystems) para confirmar la amplificación específica del gen deseado.

Las concentraciones obtenidas para cada gen problema se normalizaron con la media geométrica de aquellas obtenidas para los genes de referencia según la fórmula: expresión del gen problema/media geométrica de la expresión de los dos genes de referencia, con lo que se obtiene un valor de expresión relativa, es decir, se determinan los niveles de ARNm del gen problema en relación a los niveles de ARNm de los genes de referencia.

En el caso de los tumores, el cociente de los valores obtenidos en los tejidos tumoral y normal de cada paciente nos indicó cuantas veces más o menos es expresado nuestro

gen problema en el tejido tumoral con respecto al normal. Se asignó un valor arbitrario (0.01), correspondiente a la mitad del valor mínimo detectado en la serie de pacientes, a aquellas muestras de tejido normal o tumoral en las cuales el gen de estudio no pudo ser detectado, pero sí se detectó la expresión del gen de referencia. Los pacientes en los que no se detectó el gen de referencia en la muestra tumoral o en la normal fueron excluidos del estudio.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los genes de referencia.

Genes	Secuencia	Temperatura de anillamiento (°C)
TBP	F: TCTGGGATTGTACCGCAGC	59
	R: CGAAGTGCAATGGTCTTTAGG	
SDHA	F: TGGGAACAAGAGGGCATCTG	59
	R: CCACCACTGCATCAAATTCATG	

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los marcadores estromales analizados.

Genes	Secuencia	Temperatura de anillamiento (°C)
DCSIGN	F: GACATGAGTGACTCCAAGGAAC	61
	R: AAGAGCGTGAAGGAGAGGAG	
CD163	F: CTGTTGGCCATTTTCGTCG	59
	R: CCCGGTATTGAATTTGGTGG	
α -SMA	F: CTCCCAGGGCTGTTTTCCC	59
	R: GCTTCGTCACCCACGTAGC	
FSP1	F: CTAAAGGAGCTGCTGACCCG	59
	R: GAAGTCCACCTCGTTGTCCC	
FAP	F: TCAAAACTCAGCACAGATTGC	59
	R: TTAGGAAGTGGGTCATGTGG	

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para amplificación de los genes marcadores de pluripotencia analizados.

Genes	Secuencia	Temperatura de anillamiento (°C)
SOX2	F: ACACCAATCCCATCCACACT R: GCAAACCTTCCTGCAAAGCTC	59
OCT3	F: ACTGCAGCAGATCAGCCACATCG R: ATCCTCCTGTTGTGCATAGTCGC	63
KLF4	F: CAAGTCCCGCCGCTCCATTACCAA R: CCACAGCCGTCCAGTCACAGTGG	59
LIN28	F: CGGGCATCTGTAAGTGGTTC R: CAGACCCTTGGCTGACTTCT	59
NANOG	F: CTAAGAGGTGGCAGAAAAACA R: CTGGTGGTAGGAAGAGTAAAGG	59

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los genes seleccionados para la validación del array de expresión génica.

Genes	Secuencia	Temperatura de anillamiento (°C)
GOLGA4	F:TCACAGAAAGTGAAAATAAACTTCG R:GCTGATGCTTAAGGCTTTCC	59
IGFBP3	F: AAGGGCATGCTAAAGACAGC R:TCCCTTCTTGTACAGTTGG	59
ROBO2	F:ACGGAGCTGGAACACTATGC R:GGGGATGGAGTAAGAGTTGC	59
OAS1	F:CGTGCGCTCAGCTTCG R:GATGAGGCTCTTGAGCTTGG	59
MX1	F:GACATCGCAAAAGCTGATCC R:GGAGTCAATGAGGTCGATGC	59
OAS2	F:GCTGAAGGCGTCAGAACC R:CAGGTTGGGAGAAGTCAACC	59
IFI44L	F:AGGACAGGATTCACTGTGTGG R:AGAACCTCACTGCAATCATCC	59

5. CULTIVOS CELULARES

Para los diferentes estudios *in-vitro* se han utilizado las líneas celulares derivadas de carcinoma de colon humano LIM1215 y SW480-ADH. Ambos tipos celulares se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. El medio de cultivo usado fue DMEM (Gilco Life Technologies) suplementado con 10% FBS (Invitrogen), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 0,25 µg/ml anfotericina B.

6. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunohistoquímica se desarrolló para la cuantificación de marcadores específicos de macrófagos y fibroblastos en las muestras de tejido tumoral y de mucosa normal de los pacientes con cáncer de colon. Se emplearon anticuerpos específicos para DCSIGN (5D7, Abcam), CD163 (clone 10D6, Novocastra), α -SMA (1A4, Abcam), FSP1 (DAKO, Glostrup) y FAP (Imgenex). Se realizó el marcaje celular según los procedimientos estándares, con incubación en presencia del anticuerpo primario toda la noche y posterior revelado con el sistema peroxidasa marcada con estreptavidina-biotina (LSA; Dako, Glostrup, Denmark) usando 3,3' Diaminobenzidina (DAB) como sustrato. El inmuno-marcaje se realizó usando el dispositivo de inmuno-tinción automática TechMate 500 (Dako). Como control de la técnica, se realizaron incubaciones omitiendo el anticuerpo específico o con anticuerpos no relacionados. En la evaluación de los datos obtenidos se consideró “baja” o “alta” expresión del marcador molecular en función del porcentaje de células positivas para cada muestra y para cada marcador. El análisis fue evaluado por dos patólogos de manera independiente.

La inmunofluorescencia se llevó a cabo para la caracterización de los fibroblastos primarios establecidos mediante el marcaje de Vimentina, α -SMA y Pancitoqueratina. Los fibroblastos primarios se cultivaron en placas de cultivo 1,8 cm² (Thermo Fisher Scientific) durante 24 h, tras las que se lavaron dos veces con PBS (Phosphate Buffered Saline; Lonza) y se fijaron con paraformaldehído al 4% frío durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de 5 lavados seguidos con PBS (el último con Tween al 0.05%), las células fijadas fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos para Pancitoqueratina (ab6401, Abcam), Vimentina (ab92547, Abcam) y α -SMA (ab7817, Abcam) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las muestras fueron

incubadas durante 1h con el anticuerpo secundario apropiado según la especie marcado con IgG Alexa-Fluor 488 ó 546 (Invitrogen). Después de 4 lavados con PBS, las preparaciones fueron montadas con “Vectashield Hard-Set mounting media” conteniendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, HCl) para la visualización de los núcleos celulares (Vector Laboratories Inc.) y se examinaron con un microscopio de Epifluorescencia (Nikon Eclipse Ti-S Epifluorescence microscope) equipado con una cámara digital DS-L2 (Nikon). Se tomaron imágenes representativas de diversas áreas de cada cultivo para determinar el porcentaje de células positivas.

7. SENESCENCIA CELULAR

Se determinó el grado de senescencia celular de los cultivos primarios de fibroblastos de colon mediante el uso del kit “Senescence β -Galactosidase Staining Kit” (Abcam), según las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se cultivaron las células en placas de 24 mm (Biosciences) durante 24 h antes de llevar a cabo el procedimiento de marcaje y posteriormente se tomaron 8 imágenes representativas de distintas áreas del cultivo para determinar el número de células positivas y por tanto senescentes.

8. ENSAYO DE CONTRACCIÓN DE GELES DE COLÁGENO

Los geles de colágeno en los que se embeben los fibroblastos se prepararon mezclando colágeno Tipo I (1.5 mg/ml, Rat Tail Tendon Collagen, RTTC; Biosciences), DMEM (Gilco Life Technologies; suplementado con penicilina y estreptomicina (200 U/ml) y 2 mM L-glutamina), buffer para geles de contracción (20 mM HEPES, 0.22% NaHCO₃, 0.005 N NaOH) y 20% FBS (Invitrogen). La composición incluyendo los fibroblastos se añadió en los compartimentos de una placa de cultivo de 24 mm (Biosciences). A continuación, la solución se dejó polimerizar a 37 °C durante 30 min tras los cuales los geles se liberaron de la placa y se transfirieron a placas de cultivo de 100 mm. Después de 24 h, se cuantificó el área de superficie de los geles calculándose el área de contracción. Los valores de contracción de los geles de fibroblastos se normalizaron con respecto al valor del gel control sin células.

9. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR

Las líneas celulares tumorales de colon LIM1215 y SW480-ADH se co-cultivaron con CAF y FN primarios mediante la tecnología transwells con insertos de tamaño de poro

de sus membranas de 8.0 μm (Corning Incorporated Costar). Los experimentos se realizaron en DMEN (Gibco Life Technologies) conteniendo 1% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{m}$ estreptomicina y 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anfotericina B. Previamente al co-cultivo, las células epiteliales fueron marcadas para distinguirlas de los fibroblastos con un marcador de peso molecular (Cell Tracker Red CMTPX C34552, Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Las células fueron co-cultivadas con separación física de manera que los fibroblastos primarios se sembraron en el compartimento inferior del transwell y las células tumorales de colon en el compartimento superior. Después de 48 h las células epiteliales que alcanzaron la cara interna del filtro del inserto o el compartimento inferior, se recogieron mediante tripsinización y se cuantificaron por fluorescencia con un lector de placas (Tecan Infinite 200Pro.) (Excitación: 590 nm; Emisión: 635 nm) mediante la interpolación con una curva estándar.

10. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Los CAF se diferenciaron a osteoblastos añadiendo el medio “human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium” (Lonza) a cultivos confluentes durante 16 días siguiendo las instrucciones del fabricante. Este proceso de diferenciación conlleva la formación de nódulos de hidroxapatita y otros compuestos orgánicos en las células. La mineralización se evaluó con el kit OsteoImage Mineralization Assay (Lonza) según las instrucciones del fabricante y se cuantificó con un lector de placas (Tecan Infinite 200Pro.).

11. ARRAY DE EXPRESIÓN GÉNICA

Todas las muestras de ARN total procedente de las muestras de CAF se procesaron de acuerdo con el protocolo de Affymetrix (Affymetrix expression manual). Se hibridaron 2 μg de ADNc fragmentado y etiquetado con las placas de arrays (Human Gene 1.0 ST). Las placas de arrays se lavaron y se tiñeron usando Affymetrix Fluidics Station 450. Se cuantificó la fluorescencia mediante Affymetrix GS3000.

11.1 Análisis de datos

Se corrigió el bagaje de los archivos CEL de Affymetrix y se normalizaron los datos mediante el software Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) “affy”, version 1.28.1

(Gautier *et al.*, 2004). La calidad del experimento de arrays se verificó mediante el software Bioconductor, “arrayQualityMetrics” (Kauffmann *et al.*, 2009) (Bioconductor versión 3.2.4 de la versión 2.7; R versión 2.12.1).

Para determinar los genes Diferencialmente Expresados (DE) entre dos condiciones experimentales, se utilizó el software Bioconductor LIMMA (Smyth, 2004) así, se generaron matrices de contraste y se ajustó el modelo lineal correspondiente. A continuación, las sondas fueron contrastadas utilizando el software EnSEMBL genes (versión 68) (Hubbard *et al.*, 2007). Cuando más de una sonda identificaba el mismo gen, se consideró el valor promedio de expresión (maximización). Los datos brutos y normalizados del array se remitieron a la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de acceso GSE51257. Para determinar los perfiles de genes DE en los CAF, se restó a cada muestra el valor medio de expresión de dos muestras de FN. Para los genes DE de forma significativa, se consideró el valor de p inferior a 0,05 como punto de corte, y el incremento Log2 como punto de corte en “0,5”.

11.2 Clasificación ontológica y de vías moleculares enriquecidas

La clasificación funcional de los genes DE se basa en la base de datos “Gene Ontology” (GO) (Ashburner *et al.*, 2000; <http://www.geneontology.org>), tal como se extrae del software EnSEMBL (versión 68) (Hubbard *et al.*, 2007.) y de la base de datos “KEGG pathway” (Kanehisa *et al.*, 2008). En consecuencia, todos los genes se clasificaron en tres categorías ontológicas: (i) proceso biológico, (ii) componente celular y (iii) función y vía molecular cuando fue posible. Se consideraron significativas sólo las categorías GO/pathway, en las que se identificaban al menos 10 genes. Utilizamos el software “Gtools” para el análisis de enriquecimiento y la generación de mapas autoorganizativos (Pérez-Llamas y López-Bigas, 2011; www.gitools.org). Los valores p obtenidos fueron ajustados para múltiples pruebas con el test de Benjamin y con el método “Hochberg’s False Discovery Rate” (FDR) (Benjamini *et al.*, 1995 y 2001).

11.3 Firma de expresión génica

Para la normalización de los datos se consideró el cociente entre la diferencia de expresión de cada gen a partir de sus valores de la mediana en todas las muestras y la desviación estándar. A continuación, se utilizó el test estadístico ANOVA para

determinar el conjunto de genes (firma génica) alterados de manera significativa entre los grupos de CAF más y menos pro-migratorios (valor de $p \leq 0,05$). Para ello, se contrastaron muestras de CAF de baja y media migración (B y M) englobados en un mismo grupo respecto a muestras de CAF de alta y muy alta migración (A y EA) incluidos en otro grupo.

11.4 Dicotomización de los pacientes de cáncer de colon respecto a la expresión de la firma génica

Para determinar el valor pronóstico y la relevancia clínica en cáncer de colon de la firma génica obtenida, los datos del array de expresión se contrastaron con los extraídos de la base de datos de 232 pacientes con cáncer de colon, descargados de la base GEO, con el número de acceso GSE17538. Los datos en bruto se normalizaron como se describió anteriormente y fueron contrastados mediante el análisis “Sample Level Enrichment Analysis” (SLEA) (Gundem y López-Bigas, 2012) con el software Gtools “z-score modular” (Pérez-Llamas y López-Bigas, 2011). Las puntuaciones positivas y negativas del valor z de las muestras de los pacientes indican un nivel de expresión significativamente más alto o más bajo de los genes de la firma de expresión, respectivamente, permitiendo la dicotomización de los pacientes.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se han llevado a cabo diferentes test estadísticos dependiendo del estudio realizado. Así:

- En el estudio de marcadores moleculares en la serie de pacientes se empleó el test de correlación de Spearman para estudiar la asociación entre los niveles de expresión de los genes α -SMA, FSP1, FAP, CD163 and DCSIGN en las muestras tumorales. La asociación entre los datos de proteína y ARNm se evaluó con el test de “t de Student”, estudiando la varianza con el test de “Levene”.

Los datos de expresión de los genes se dividieron en terciles (33% y 66%) para considerar tres grupos con el mismo número de pacientes y analizar su posible correlación con parámetros clínico-patológicos (mediante el test χ^2) y con los datos de supervivencia mediante los análisis Kaplan-Meier y Cox. Así, los pacientes incluidos en el primer tercil se consideraron el grupo de baja expresión, mientras que los

pertenecientes al segundo y tercer tercil, se clasificaron en el grupo de media y alta expresión.

- En el estudio de los fibroblastos primarios, se utilizó el test de “t de Student”, evaluando la varianza con el test de “Levene”, para analizar las asociaciones entre los niveles de expresión de los genes, las capacidades de contracción de los geles de colágeno con los diferentes grupos pro-migratorios de fibroblastos y las diferencias en los efectos pro-migratorios sobre las células tumorales de los CAF, y entre CAF y FN.

Los datos de supervivencia de los pacientes se obtuvieron de la base de datos GEO con código GSE17538. Mediante los test estadísticos de Kaplan-Meier y Cox, con el software “survival” y “survplot”, se analizó la asociación entre la expresión de la firma génica y la supervivencia de los pacientes. Para la validación de ésta, se usó una serie externa de 142 pacientes con cáncer de colon en los que se analizó la expresión de diferentes genes por RT-PCR. Los datos de expresión de los genes cuantificados en la serie de pacientes se dividieron en cuartiles (25%, 50% y 75%) considerándose cuatro grupos con el mismo número de pacientes. Se analizó su posible correlación con los datos de supervivencia mediante los análisis Kaplan-Meier y Cox. Los cuartiles se agruparon en base a su similitud en el comportamiento matemático y esto permitió la dicotomización de los pacientes en dos grupos, de baja y alta expresión.

En todos los tipos de análisis se consideraron valores significativos p inferiores a 0,05 para dos colas. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS v14.0.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES CARACTERÍSTICOS DE ESTROMA ACTIVADO EN CÁNCER COLORRECTAL. VALOR APLICABLE

1.1. Datos descriptivos de la serie de pacientes y de los marcadores de estroma

Para el estudio del valor pronóstico de los marcadores moleculares característicos de estroma activado, se contó con una serie de 289 pacientes con CC de los cuales se habían obtenido muestras de tejido tumoral y mucosa colónica normal de cada uno de ellos. La serie estaba compuesta por 179 varones (62%) y 110 mujeres (38%). 18 pacientes presentaban tumores en estadio patológico I, 157 en estadio II, 100 en estadio III y 14 en estadio IV. El seguimiento de los pacientes se realizó durante un promedio de 5 años (rango de seguimiento: 1-187 meses) registrándose 86 recidivas y 88 fallecimientos entre los 275 pacientes con datos conocidos. En la Tabla 5 se detalla el número de individuos en los que fue posible la detección de los marcadores de estroma correspondientes y el resumen de sus valores de expresión obtenidos en la serie de pacientes.

Se observó, en base al test de Spearman, una correlación directa entre la expresión de ARNm de los marcadores de CAF y de macrófagos M2, excepto para FAP y DCSIGN (Tabla 6).

En paralelo, se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión de las proteínas DCSIGN, CD163, α -SMA, FSP1 y FAP en 60 muestras de tejido tumoral y normal. Los niveles de proteína se clasificaron en “altos o bajos” para evaluar su relación con los correspondientes niveles de ARNm de cada marcador (Figura 3 A). De esta manera, se determinó asociación estadística entre los niveles de expresión de ARNm y los niveles de proteína para los marcadores FSP1 y FAP. Además, se observó la misma tendencia para el resto de marcadores estudiados (Figura 3 B).

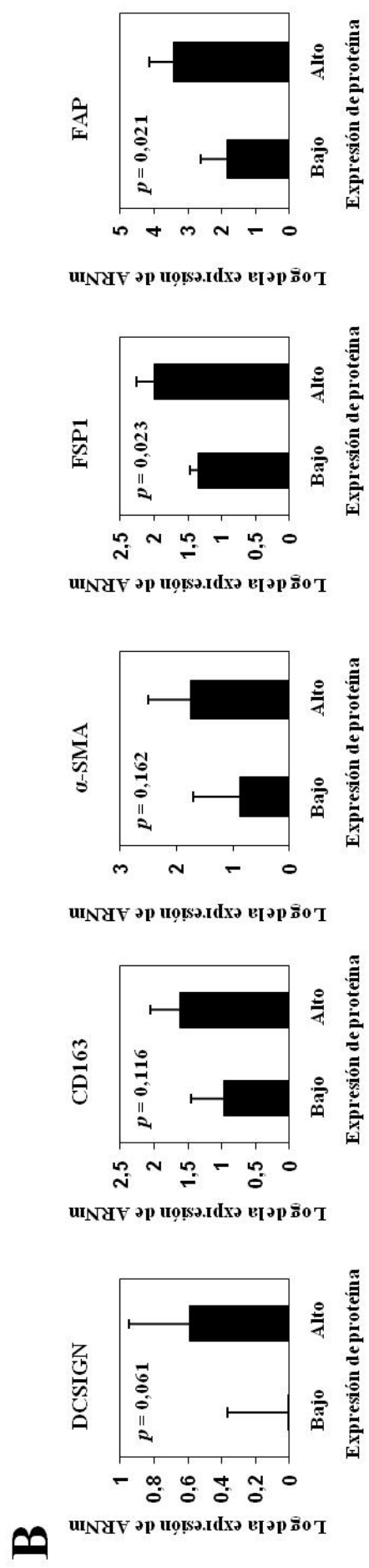
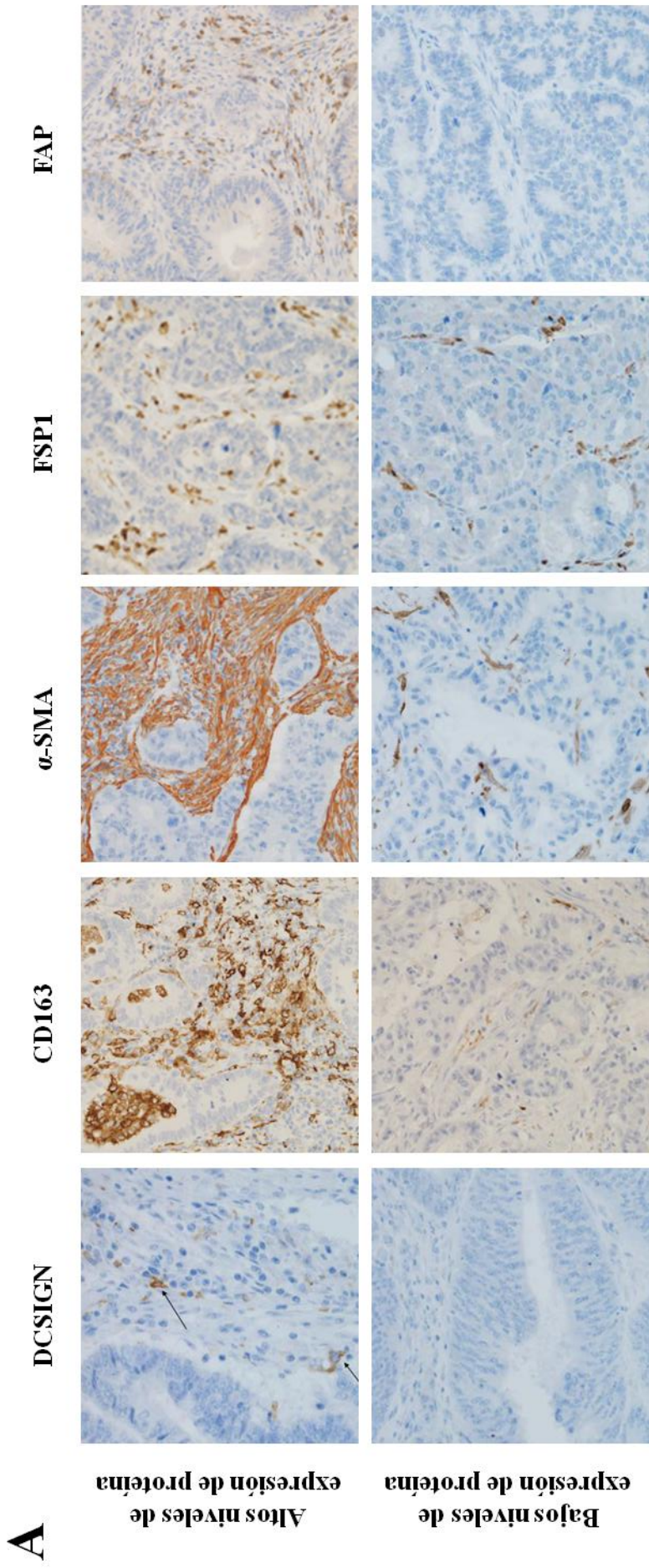
Tabla 5. Resumen de los valores de expresión de los marcadores CAF y M2 en la serie de pacientes con CC.

	DCSIGN	CD163	α-SMA	FSP1	FAP
N	239	235	270	264	208
Media	0,31	1,18	0,52	1,90	14,48
Valor mínimo	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Valor máximo	62,34	2227,07	522,47	642,67	299093,11
Percentil 33	0,16	0,39	0,2	0,76	3,90
Percentil 66	0,58	2,72	1,24	3,97	60,95

Tabla 6. Correlación entre los niveles de expresión de los marcadores CAF y M2.

	CD163	α-SMA	FSP1	FAP
DCSIGN	$r = 0,321; p < 0,001$	$r = 0,381; p < 0,001$	$r = 0,181; p = 0,007$	$r = 0,008; p = 0,916$
CD163		$r = 0,460; p < 0,001$	$r = 0,257; p < 0,001$	$r = 0,419; p < 0,001$
α-SMA			$r = 0,314; p < 0,001$	$r = 0,333; p < 0,001$
FSP1				$r = 0,445; p < 0,001$

Figura 3. Inmunohistoquímica y expresión cuantitativa de ARNm de los marcadores CAF y de macrófagos M2. (A) Inmunohistoquímica de los marcadores de macrófagos M2, DCSIGN y CD163, y de los marcadores de CAF, α -SMA, FSP1 y FAP. Imágenes representativas de los niveles de expresión de proteína (altos y bajos) de los marcadores estudiados en las muestras de tumores humanos. Las flechas indican las células positivas. Ampliación original, 20X. (B) Asociación estadística entre los niveles de expresión de proteína y los niveles de ARNm para cada marcador. Asociación estadística entre los niveles de proteína y de ARNm para los marcadores de macrófagos M2, DCSIGN y CD163 y del marcador CAF α -SMA. Los gráficos de barras muestran la media y el intervalo de confianza de los niveles de expresión de ARNm de cada marcador en los grupos de alta y baja expresión de proteína.



1.2. Asociación de la expresión de ARNm de los marcadores CAF y de macrófagos M2 con las características clínicas de los pacientes con CC

El estudio comparativo de los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de estroma y las variables clínicas de los pacientes mostró distintas asociaciones estadísticas. Así, se observó correlación estadística entre los niveles de ARNm de CD163, α -SMA y FSP-1 y recidiva de los pacientes ($p = 0,023$; $p = 0,028$ y $p = 0,012$, respectivamente), no obstante, para la expresión de FAP solo se detectó una tendencia a esta asociación ($p = 0,083$). Además, se asoció estadísticamente la expresión de CD163 con *exitus* de los pacientes ($p = 0,029$), mientras que para la expresión de α -SMA, FSP1 y FAP solo se detectó una tendencia hacia esta asociación ($p = 0,154$; $p = 0,067$ y $p = 0,143$, respectivamente).

No se encontraron correlaciones estadísticas entre la expresión de los marcadores de estroma analizados y otras variables clínico-patológicas, incluyendo el sexo de los pacientes, localización del tumor, grado histológico, invasión vascular, poliposis, metástasis en los ganglios linfáticos y estadio patológico.

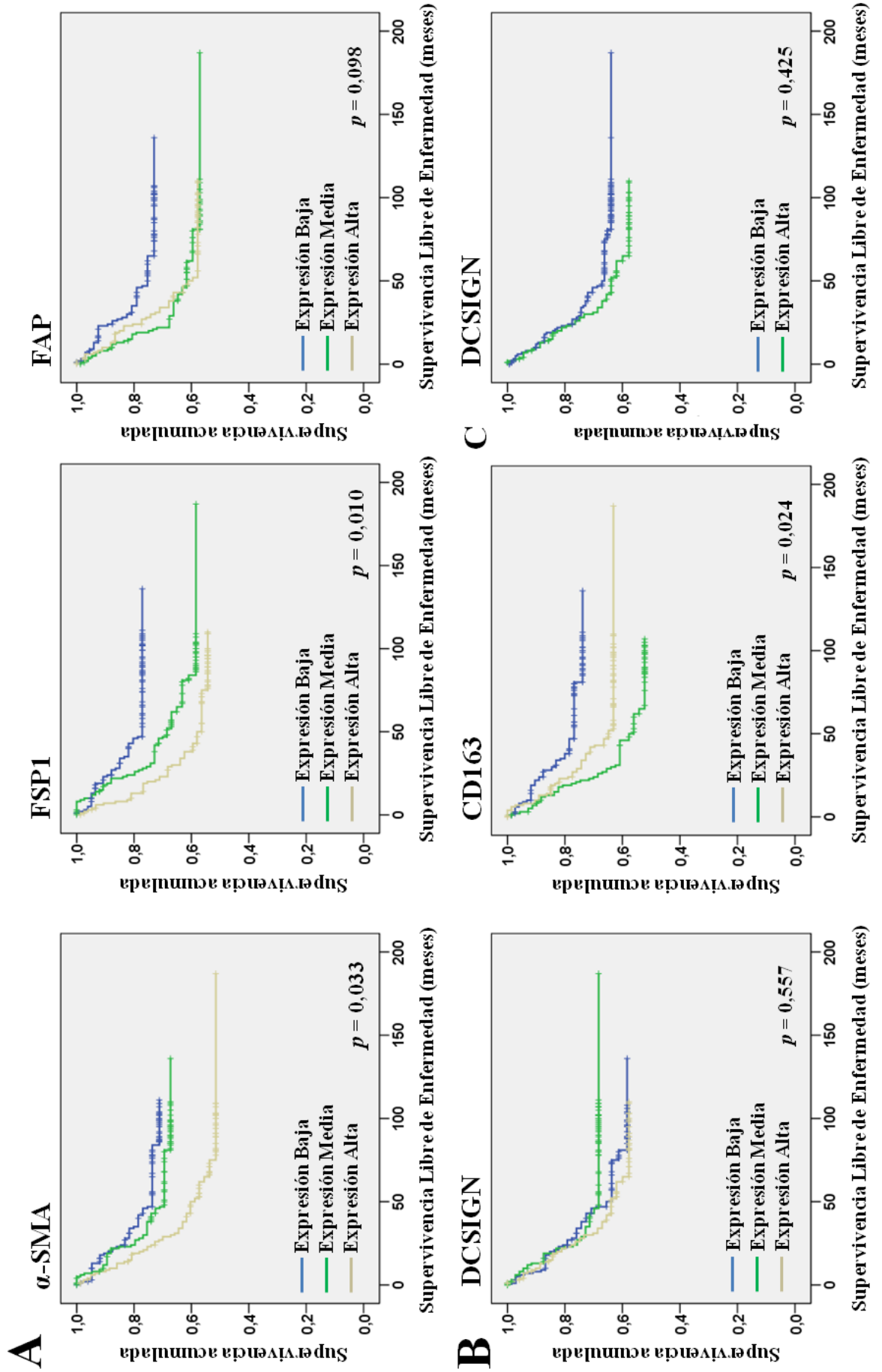
1.3. Asociación de la expresión de ARNm de los marcadores de CAF y de macrófagos M2 con la supervivencia de los pacientes con CC

El análisis de Kaplan-Meier de los valores de expresión de ARNm de los marcadores de estroma y los datos de supervivencia de los pacientes mostró importantes asociaciones estadísticas. Así, se demostró una correlación entre la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de CAF, α -SMA y FSP-1, y del marcador de macrófagos M2, CD163 (Figura 4 A, B). Asimismo, se observó esta misma tendencia entre los niveles de expresión del marcador FAP y la SLE (Figura 4 A). Como se puede observar en las figuras, el análisis estadístico mostró un comportamiento similar entre los datos de expresión correspondientes a diferentes terciles para cada gen estudiado. En consecuencia, para simplificar el estudio, los terciles, con igual comportamiento matemático, se agruparon y se clasificaron como de “alta” y “baja” expresión del gen en cuestión (Figura 4). Este análisis optimizó el valor pronóstico de CD163, α -SMA, FSP-1 y FAP para la SLE (Figura 5).

Paralelamente, se consideró también la expresión de los marcadores estromales en relación a la supervivencia global (SG) de los pacientes con CC, observándose una asociación estadística con los niveles de expresión de ARNm de CD163 y FSP-1 (Figura 6 A, C). Los pacientes cuyos tumores tenían altos niveles de expresión de α -SMA o FAP también mostraron tendencia hacia una SG más corta (Figura 6 B, D).

En conjunto, estos resultados indican la importancia clínica de los marcadores de CAF, α -SMA, FSP1 y FAP, y del marcador de macrófago M2, CD163, ya que todos ellos mostraron asociación estadística con la supervivencia de los pacientes con CC. No se encontró asociación entre DCSIGN y la SLE o la SG de los pacientes. La dicotomización de esta variable, en función del comportamiento matemático de sus terciles, tampoco mostró ninguna asociación estadística (Figura 4 B, C). No obstante, esta variable se incluyó en los demás test estadísticos ya que el análisis de Cox demostró su implicación en el valor pronóstico del CC.

Figura 4. Análisis de Kaplan-Meier entre los niveles de expresión de los marcadores de CAF y de macrófagos M2, individualmente, y la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con CC. Los pacientes de la serie se dividieron por terciles en función de los niveles de expresión de cada gen estudiado. Así, los pacientes se agruparon en pacientes con niveles de expresión baja, media y alta para cada marcador. Asociación estadística de los marcadores de CAF, α -SMA y FSP1 (A) y del marcador M2, CD163 (B) con la SLE de los pacientes. Los niveles de expresión del marcador FAP mostraron una tendencia hacia la asociación con la SLE (A). No obstante, no se observó asociación entre la expresión del marcador de macrófagos M2, DCSIGN y la SLE (B). Tampoco se observó asociación entre el marcador de M2, DCSIGN y la SLE ni siquiera cuando los datos de expresión de los terciles de baja y media expresión para este marcador se agruparon en una sola variable de “Expresión Baja” (C).



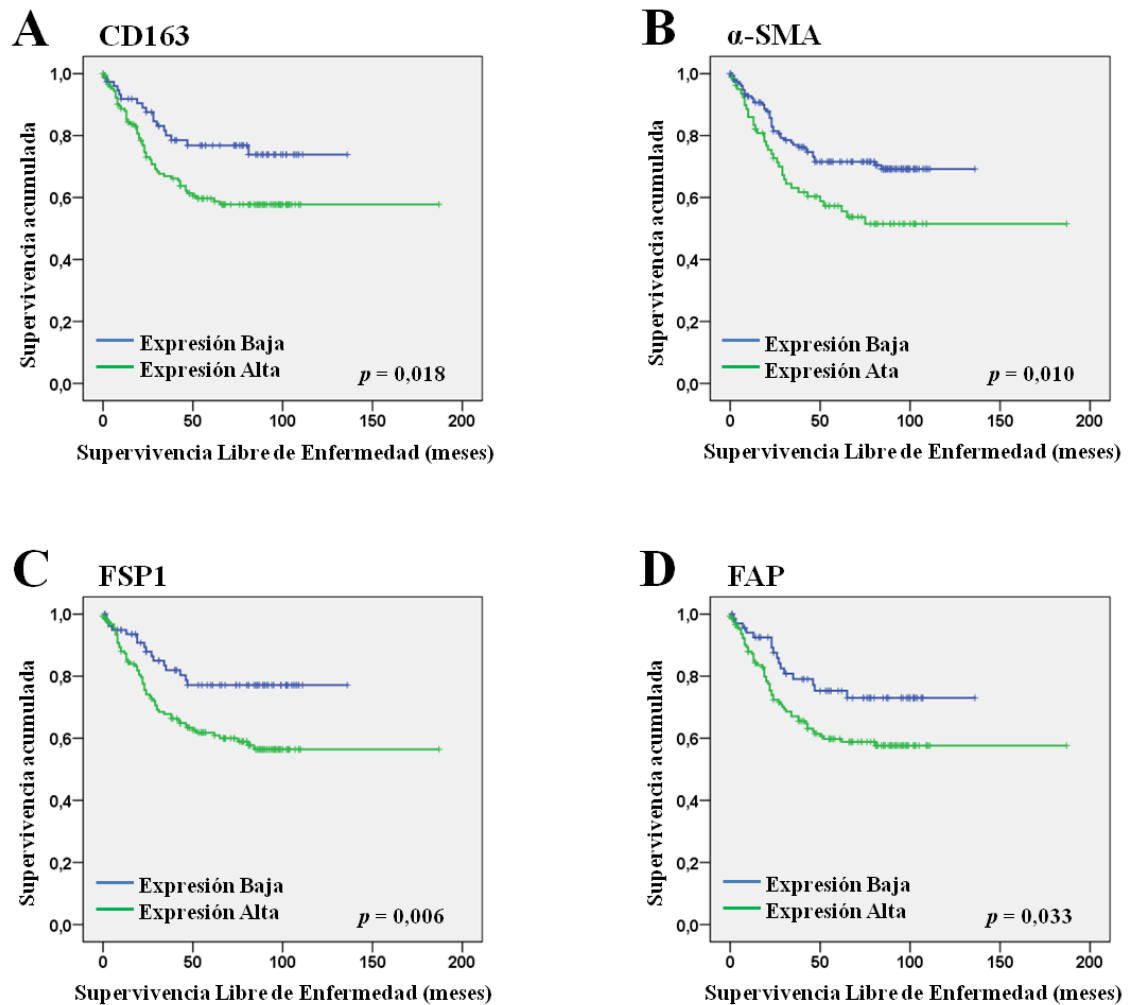


Figura 5. Análisis de Kaplan-Meier entre los niveles de expresión de los marcadores de CAF y los de macrófagos M2 (individualmente) y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CC. Asociación del marcador de macrófagos M2, CD163 (A), y los marcadores de CAF, α -SMA (B), FSP1 (C) y FAP (D) con la SLE de los pacientes. “Expresión Baja” hace referencia al tercil de expresión baja de α -SMA y a los terciles de expresión baja y media de los marcadores CD163, FSP1 y FAP.

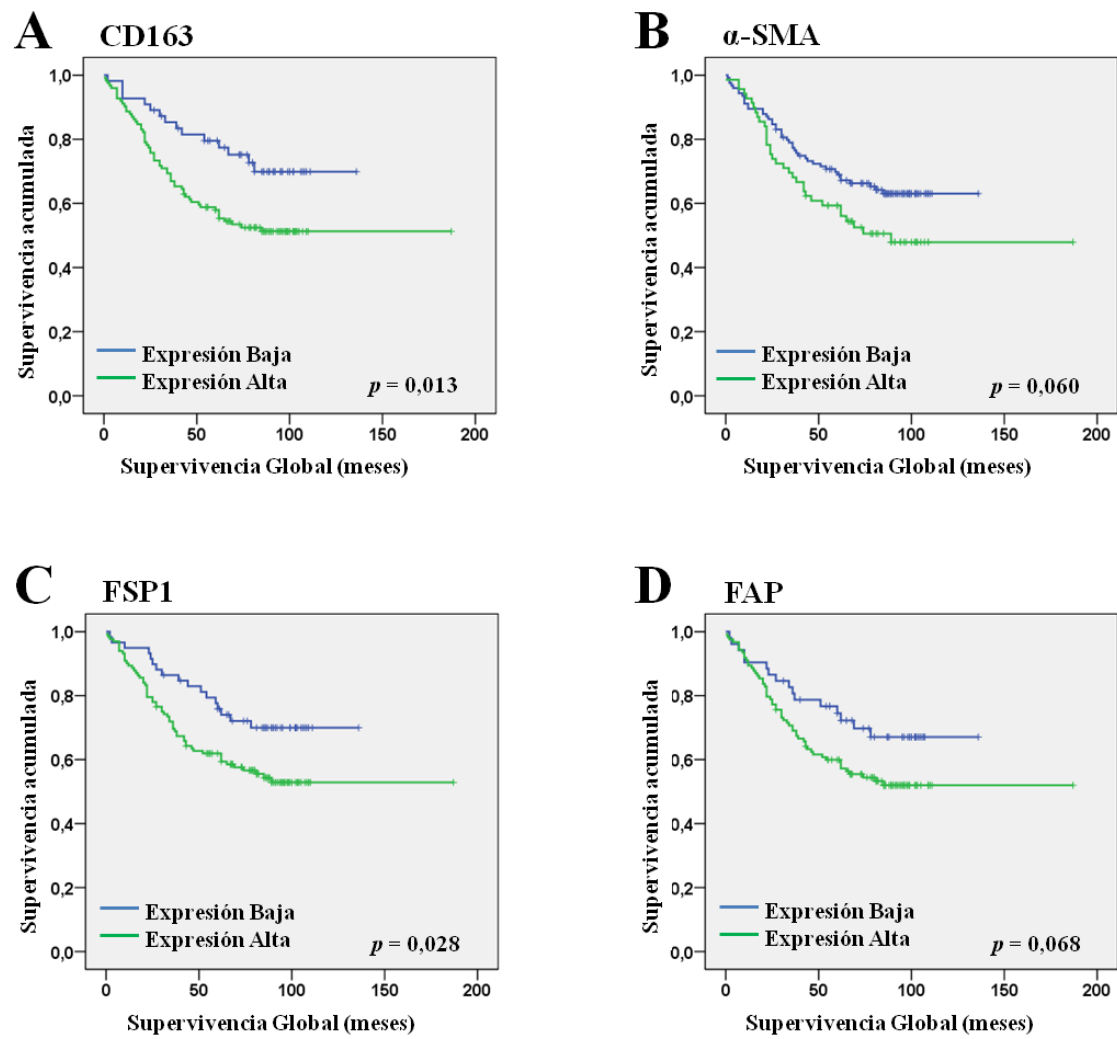


Figura 6. Análisis de Kaplan-Meier de los niveles de expresión de los marcadores de CAF y los de macrófagos M2 (individualmente) y la supervivencia global en pacientes con CC. Asociación del marcador de macrófagos M2, CD163 (A), y del marcador de CAF, FSP1 (C) con la SG de los pacientes. Tendencia a la asociación de la expresión de los marcadores de CAF, α -SMA (B) y FAP (D) con la SG.

1.4. Asociación de la combinación de marcadores de CAF y de macrófagos M2 con la supervivencia de los pacientes con CC

Para estudiar el posible efecto aditivo de la expresión de los diferentes marcadores, se clasificaron los pacientes en diferentes grupos de acuerdo con el número de marcadores de CAF y M2 que tuvieran expresión elevada. Por lo tanto, los pacientes se aunaron primero en base a la expresión de cero, uno, dos o tres marcadores de CAF elevados y en relación a la expresión alta de cero, uno o dos marcadores de macrófagos M2. El análisis estadístico de estos datos manifestó así una asociación con la SLE ($p = 0,009$ y $p = 0,030$, respectivamente). A continuación, para establecer una dicotomía en el análisis, y en base a la semejanza en el comportamiento matemático, los pacientes con alta expresión de cero, uno o dos marcadores de CAF se agruparon como de “bajo perfil CAF” frente a aquellos con tres marcadores, clasificados como de “alto perfil CAF”. Del mismo modo, el grupo de “bajo perfil M2” incluyó aquellos pacientes sin expresión de marcadores M2 y el grupo de “alto perfil M2” consideró aquellos pacientes con expresión elevada de uno o dos marcadores de M2. Estos nuevos datos confirmaron la anterior asociación observada con la SLE y la SG de los pacientes (marcadores de CAF: $p = 0,004$ y $p = 0,038$; marcadores M2: $p = 0,009$ y $p = 0,015$, para la SLE y la SG, respectivamente).

Por último, se combinó la expresión de los marcadores estromales en una nueva variable “marcadores CAF-M2” y los pacientes se clasificaron de nuevo en tres grupos: a) “Expresión estromal Baja” (bajo perfil CAF y M2), b) “Expresión estromal Media” (bajo perfil CAF y alto perfil M2 o viceversa) y c) “Expresión estromal Alta” (alto perfil CAF y M2). El análisis Kaplan-Meier mostró asociación estadística entre la variable marcadores CAF-M2 y la SLE y la SG de los pacientes (Figura 7 A, B, respectivamente). En paralelo, el análisis multivariante de Cox determinó la variable marcadores CAF-M2, junto con las variables invasión vascular, grado histológico y estadio patológico como variables con valor pronóstico independiente para la SLE (Tabla 7) y la variable marcadores CAF-M2, junto con invasión vascular y estadio patológico para la SG de los pacientes (Tabla 7).

1.5. Asociación de la combinación de marcadores de CAF y de macrófagos M2 con la supervivencia de los pacientes con CC según el estadio de los tumores y la localización tumoral

Por último, se estudió el valor pronóstico de los marcadores CAF-M2 en los diferentes estadios tumorales. El análisis determinó asociación estadística entre los valores de expresión de los marcadores de CAF-M2 y la SLE en pacientes con estadios tempranos ($p = 0,052$) y también en avanzados ($p = 0,050$) (Figura 7 C). Sin embargo, esta variable en relación a la SG mostró valor pronóstico en los pacientes con estadios III y IV ($p = 0,069$) (Figura 7 D), pero no en aquellos con estadios tempranos ($p = 0,596$).

Por lo tanto, los resultados sugirieron que los marcadores CAF-M2 combinados constituyen una variable predictiva más útil en etapas avanzadas de la enfermedad para la SG. En consecuencia, se realizó de nuevo el análisis multivariante de Cox estratificando la serie por estadios, confirmándose así que la variable marcadores CAF-M2 interactúa con el estadio patológico tumoral, y tiene valor pronóstico para la SG en pacientes en estadio III o IV (Tabla 8).

Finalmente, se analizó la variable marcadores CAF-M2 con respecto a la localización anatómica del tumor determinándose su valor pronóstico para la SLE y la SG en los pacientes con tumores de colon (Figura 7 E, F, respectivamente). Por el contrario, no se observó implicación de la variable CAF-M2 en la supervivencia de los pacientes con carcinomas rectales.

Figura 7. Análisis de Kaplan-Meier entre la expresión de los marcadores CAF y los de macrófagos M2 y la supervivencia de los pacientes CC (A, B). Asociación entre la variable marcadores CAF-M2 y la SLE (A) y la SG (B). La categoría “Expresión estromal Baja” incluye los pacientes con marcadores de CAF y marcadores M2 de perfil bajo. La categoría “Expresión estromal Media” comprende los pacientes con marcadores de CAF de perfil alto y marcadores M2 de perfil bajo o viceversa. La categoría “Expresión estromal Alta” engloba los pacientes con marcadores de CAF y M2 de perfil alto. **Curvas de Kaplan-Meier entre la variable expresión de marcadores de CAF junto con la variable para expresión de macrófagos M2 y supervivencia de los pacientes CC según el estadio patológico (C, D). Asimismo se observó una tendencia a la asociación estadística en estadios patológicos avanzados de CAF-M2 con la SLE en pacientes con estadios patológicos avanzados (C). **Curvas de Kaplan-Meier entre la variable CAF-M2 y la supervivencia en relación con la localización del tumor en pacientes con CC (E, F).** Se observó asociación estadística entre la variable CAF-M2 y la SLE en pacientes con CC (E). Se encontraron resultados similares para la SG, detectándose una asociación entre la variable CAF-M2 y la SG en pacientes con CC (F).**

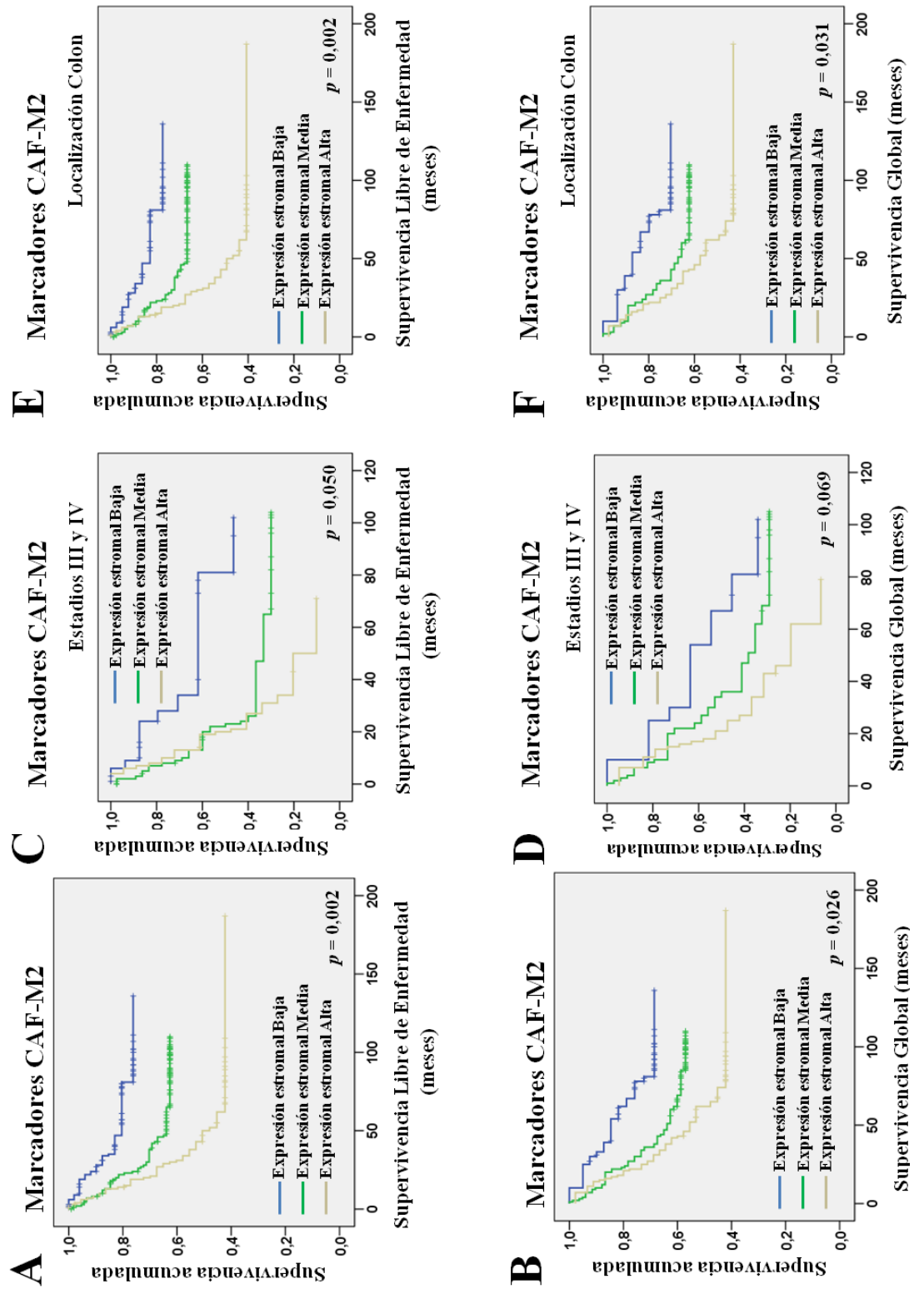


Tabla 7. Análisis Multivariante de Cox para la expresión de los marcadores CAF-M2 y la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de los pacientes con CC.

	Variable	Categoría	HR	(IC 95%)	p-valor
Supervivencia Libre de Enfermedad	Invasión vascular	Sí vs No	1.775	1.045-3.015	0.034
	Grado Histológico				0.082
		II vs I	1.381	0.781-2.443	0.267
		III vs I	2.511	1.121-5.625	0.025
	Estadio Patológico	C + D vs A + B	3.857	2.245-6.627	<0.001
	Marcadores CAF-M2				0.008
		Expresión estromal Media vs Baja	2.219	1.093-4.503	0.027
		Expresión estromal Alta vs Baja	3.319	1.555-7.085	0.002
Supervivencia Global	Invasión Vascular	Sí vs No	1.649	0.979-2.778	0.060
	Estadio Patológico	C +D vs A +B	5.001	2.824-8.856	<0.001
	Marcadores CAF-M2				0.044
		Expresión estromal Media vs Baja	1.564	0.792-3.086	0.197
		Expresión estromal Alta vs Baja	2.445	1.185-5.045	0.016

Tabla 8. Interacción estadística entre la variable CAF-M2 y el estadio patológico en el pronóstico de la supervivencia global de los pacientes con CC.

	Variable	Categoría	HR	(IC 95%)	p-valor
Supervivencia Global	Invasión Vascular	Sí vs No	1.743	1.024-2.966	0.041
	Estadio Patológico	C + D vs A + B	2.818	1.128-7.040	0.027
	CAF-M2 * Estadio				0.035
	Patológico	Estadio* Expresión estromal Media vs Baja	1.574	0.675-3.669	0.294
		Estadio* Expresión estromal Alta vs Baja	2.951	1.204-7.232	0.018

2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMORES Y PERFIL GÉNICO CON VALOR DISCRIMINATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

2.1. Los CAF primarios de colon presentan características de miofibroblastos

Se utilizó tejido fresco de mucosa normal y de tumores primarios procedentes de 15 pacientes operados de CC para el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos normales y tumorales, como se describe en la sección de Metodología (Figura 8 A). Se caracterizaron las células como fibroblastos mediante análisis morfológico e inmunohistoquímica. Así, se comprobó que los cultivos de fibroblastos asociados a tumores mantienen las propiedades fenotípicas de fibroblastos activados o miofibroblastos, aún sin la interacción con células de carcinoma ya que mostraron una morfología de huso uniforme y, además, expresión del marcador de activación α -SMA (Figura 8 B). Igualmente, se determinó el enriquecimiento de fibroblastos en los cultivos, testando la expresión de Vimentina y Pancitoqueratina (PanCK) por inmunofluorescencia (Figura 8 C). Los fibroblastos se mantuvieron durante un máximo de 7 pases, evaluándose su estado de senescencia, de manera que algunos fueron excluidos del estudio para no emplear células en senescencia replicativa (Figura 8 D).

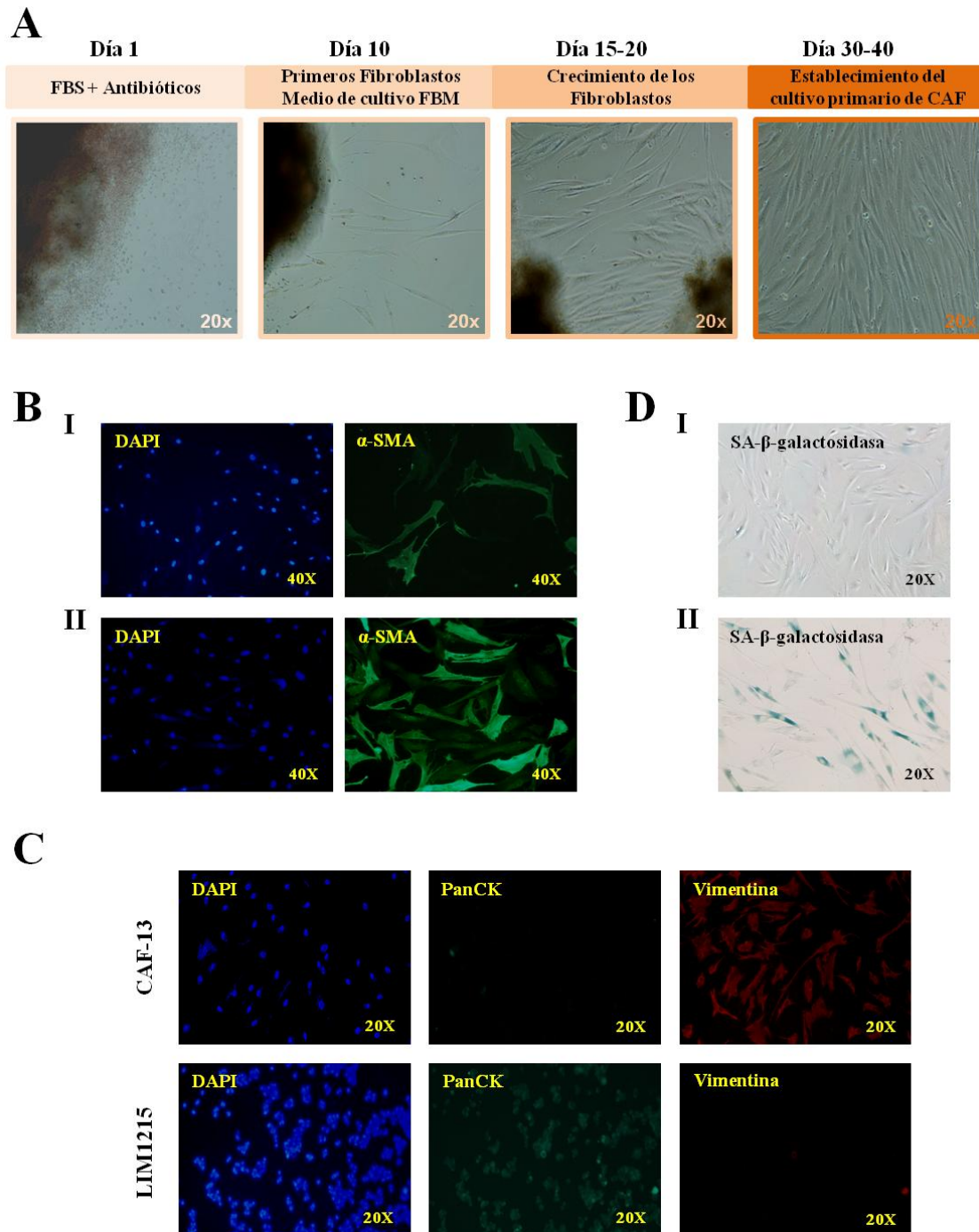


Figura 8. Establecimiento y caracterización de CAF primarios de pacientes con CC. Metodología para el establecimiento de los fibroblastos primarios a partir de tejido fresco de pacientes con CC (A). Los cultivos de CAF mostraron distintos niveles de expresión de α -SMA. En las imágenes, ejemplos de CAF con expresión de α -SMA baja y alta (BI y BII, respectivamente). La ausencia de células epiteliales en los cultivos primarios de CAF se confirmó mediante inmunofluorescencia de PanCK y Vimentina (C). La línea celular tumoral de colon LIM1215 se utilizó como control positivo para el marcaje de PanCK (C). Se usó el marcaje de β -galactosidasa para evaluar el grado de senescencia de los cultivos primarios de CAF (DI cultivo de CAF negativo para el marcaje de β -galactosidasa y DII, cultivo positivo para el marcaje positivo de β -galactosidasa).

2.2. Los CAF primarios de colon inducen efectos pro-migratorios sobre las células tumorales de forma paracrina

Se realizaron experimentos de co-cultivo de fibroblastos primarios con líneas tumorales de cáncer de colon para evaluar los efectos de los CAF y los FN en la inducción de migración de células tumorales.

Los CAF primarios aumentaron significativamente la migración de las células tumorales de colon co-cultivadas en un sistema transwell en el que éstas eran cultivadas en el compartimento superior y los fibroblastos en el inferior. Se observaron claras diferencias en los efectos pro-migratorios de los CAF procedentes de diferentes pacientes sobre las células tumorales. Así, los CAF primarios estimularon la migración de la línea tumoral de colon LIM1215 entre 5 y 140 veces en relación a la migración de estas células solas. En base a estos datos, los CAF se clasificaron en cuatro subtipos: Grupo pro-migratorio “Bajo”(B), que incluye CAF que no aumentan la migración de las LIM1215 más de 10 veces; Grupo pro-migratorio “Medio” (M), que contiene aquellos CAF que provocan un aumento en la migración de 10 a 25 veces; Grupo pro-migratorio “Alto” (A) compuesto por CAF que inducen de 25 a 50 veces la migración, y el Grupo pro-migratorio “Extra-Alto” (EA) con los CAF capaces de aumentar la migración de las células tumorales LIM1215 más de 50 veces (Figura 9 A).

Se analizaron los efectos pro-migratorios de 6 cultivos primarios de FN sobre las células tumorales. Aunque los fibroblastos primarios normales estimulaban la migración de las células tumorales en relación a la migración de estas células solas, los efectos pro-migratorios paracrinicos inducidos por los CAF previamente observados eran mayores que los provocados por los FN (Figura 9 B).

No se detectó asociación entre el número de pases o duplicaciones celulares de los cultivos de fibroblastos y los efectos pro-migratorios de éstos sobre las células tumorales (Figura 9 C)

Finalmente, las diferencias en los efectos pro-migratorios paracrinicos de los fibroblastos asociados a tumores sobre las células tumorales se validaron con CAF aleatorios de 4 pacientes en ensayos de migración con otra línea celular tumoral de colon, SW480-ADH. Se obtuvieron resultados similares a los observados previamente con las células

LIM1215 de colon (Figura 10 A). De hecho, se observó una correlación estadística en los niveles de migración inducida, derivada de los CAF, en ambas líneas tumorales, LIM1215 y SW480-ADH (Figura 10 B).

En suma, estos experimentos demostraron que los efectos pro-migratorios de los fibroblastos asociados a tumores sobre células humanas de cáncer de colon varían entre diferentes pacientes.

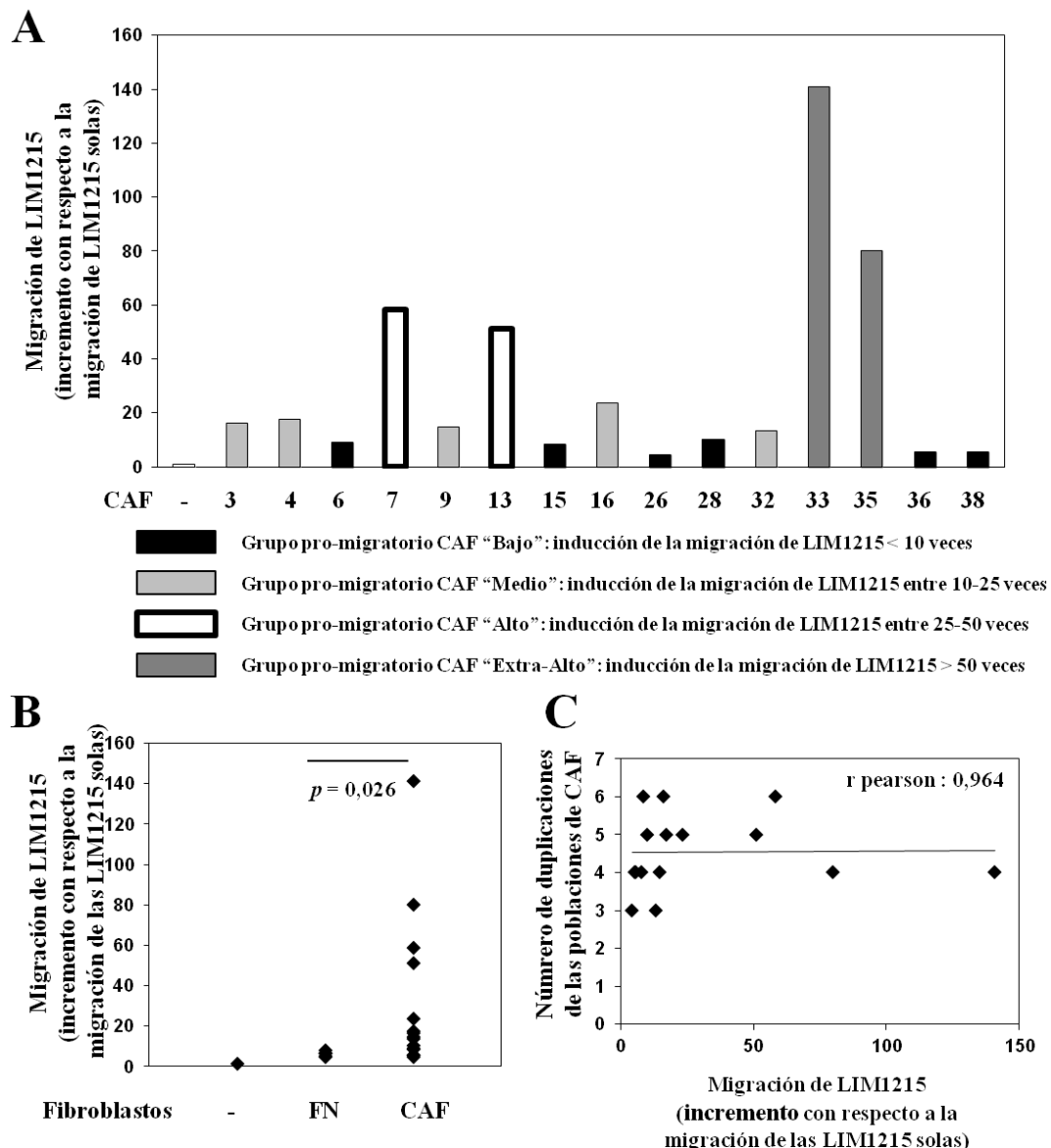


Figura 9. Los CAF estimulan la migración de células humanas tumorales de colon. Clasificación de los CAF primarios, según su capacidad de estimular la migración de las células de colon LIM1215, en distintos grupos pro-migratorios: “Bajo”, “Medio”, “Alto” y “Extra-Alto”. El número en el eje X indica los ID de los pacientes de CC (A). **Comparación entre los efectos paracrinicos pro-migratorios derivados de los CAF y los FN sobre las células de colon.** Los efectos pro-migratorios de los CAF son mayores que los inducidos por los FN (B). **Crecimiento celular de los cultivos CAF.** No se encontraron diferencias entre el número de pases o duplicaciones celulares y los efectos paracrinicos pro-migratorios derivados de los CAF (C).

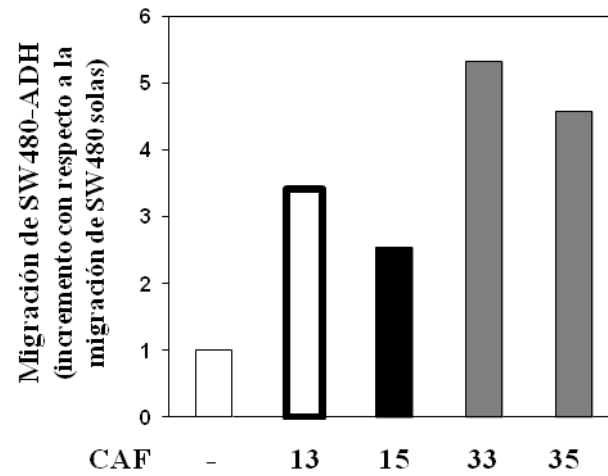
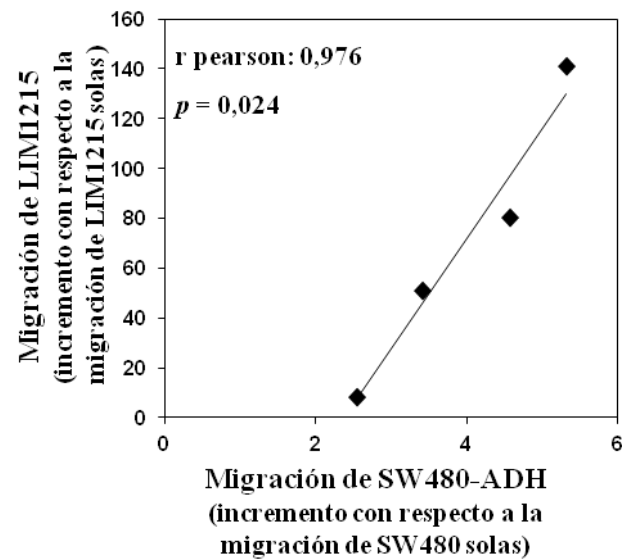
A**B**

Figura 10. Validación de los efectos pro-migratorios observados en las células tumorales de colon. Migración de las células SW480-ADH con 4 CAF aleatorios de cada grupo pro-migratorio (A). Correlación estadística entre los efectos pro-migratorios de las líneas de CAF sobre las células LIM1215 y SW480-ADH (B).

2.3. Los CAF más pro-migratorios muestran propiedades de fibroblasto activo

Se realizaron varios análisis para evaluar si los CAF más pro-migratorios mostraban características clásicas de fibroblasto activo.

En primer lugar, se determinaron los niveles de expresión de ARNm de α -SMA en los distintos cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores. Los CAF en los que el aumento de la migración de células de cáncer de colon era mayor de 25 veces (grupos pro-migratorios “A” y “EA”) tenían niveles más altos de expresión de α -SMA que los CAF de los grupos “B” y “M” (Figura 11 A).

A continuación, se cuantificó en los CAF su capacidad de contracción de fibras de colágeno como marcador de fibroblasto activo. Para ello, se llevó a cabo el ensayo de contracción de geles de colágeno con una línea de CAF, seleccionada al azar, como representante de cada grupo pro-migratorio. Se observó asociación estadística entre la capacidad de contracción del gel de colágeno de los distintos grupos de CAF y la inducción de efectos pro-migratorios en las células tumorales (Figura 11 B).

En conjunto, estos datos indican una asociación estadística entre la estimulación pro-migratoria de los CAF sobre las células de cáncer de colon y su grado de activación.

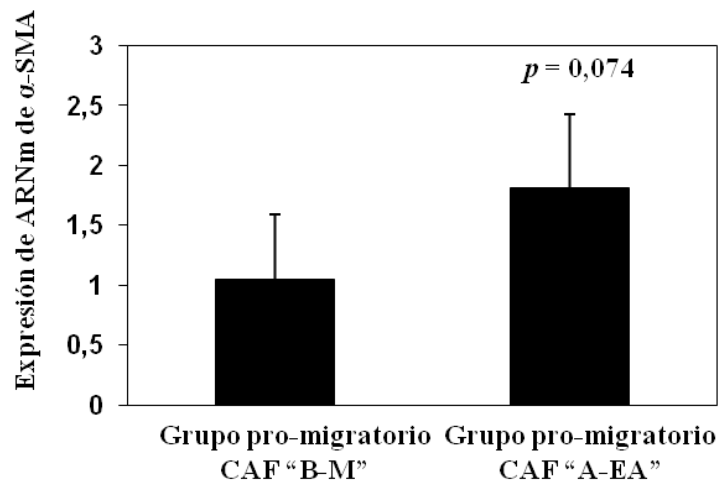
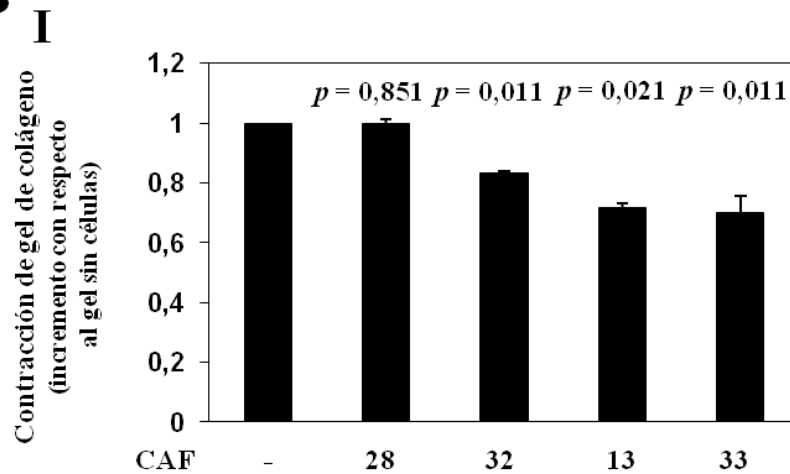
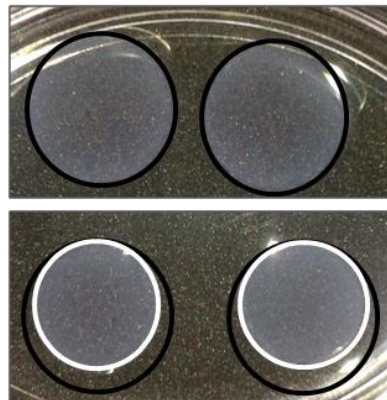
A**B****II**

Figura 11. Los efectos paracrin pro-migratorios derivados de los CAF están asociados con características de fibroblasto activo y con marcadores de pluripotencia. Los CAF más pro-migratorios ("A" y "EA") mostraron niveles más altos de expresión de ARNm de α -SMA (A). Asociación entre los efectos pro-migratorios de los CAF y la capacidad de contracción de geles de colágeno (BI). Ejemplo de la medición de la contracción de los geles: los círculos negros y las imágenes superiores son geles de colágeno con CAF embebidos a tiempo 0 h. Las imágenes inferiores muestran las mediciones iniciales (círculos negros) y finales (círculos blancos) después de 24 h (ambas imágenes se muestran con repeticiones) (BII).

2.4. Los CAF más pro-migratorios muestran marcadores de pluripotencia

Se evaluó la posibilidad de que los CAF más pro-migratorios tuvieran mayores características de pluripotencia.

De este modo, se determinó la expresión de los genes SOX2, OCT3, KLF4, LIN28 y NANOG como marcadores de pluripotencia en los fibroblastos asociados a tumores de colon. El análisis cuantitativo mostró mayores niveles de expresión de estos genes en los grupos de CAF más pro-migratorios (“A” y “EA”) respecto a los grupos menos pro-migratorios (“B” y “M”). Se observó una asociación estadística entre los niveles de expresión del gen OCT3 y los efectos pro-migratorios de los CAF sobre las células de cáncer de colon. Además, se detectó esa misma tendencia entre la expresión del resto de genes analizados y las habilidades pro-migratorias de los CAF, sobretodo en el caso de SOX2 y LIN28. No se detectó asociación estadística en todos los casos probablemente debido al bajo número de muestras analizadas y las diferencias intragrupo de los CAF (Figura 12 A).

El estado de pluripotencia de los diferentes CAF se analizó también mediante experimentos de diferenciación a osteoblastos empleando CAF representativos de cada grupo pro-migratorio. Así, los CAF mostraron diferenciación a osteoblastos al ser cultivados en un medio de inducción a diferenciación osteogénica. Sin embargo, no se encontró asociación entre el grado de diferenciación a osteoblastos y las habilidades pro-migratorias observadas en los CAF (Figura 12 B).

En resumen, estos datos sugieren una asociación entre los CAF y las características de pluripotencia aunque no se encontraron evidencias concluyentes entre el grado de pluripotencia de los CAF y sus efectos pro-migratorios sobre las células tumorales de colon.

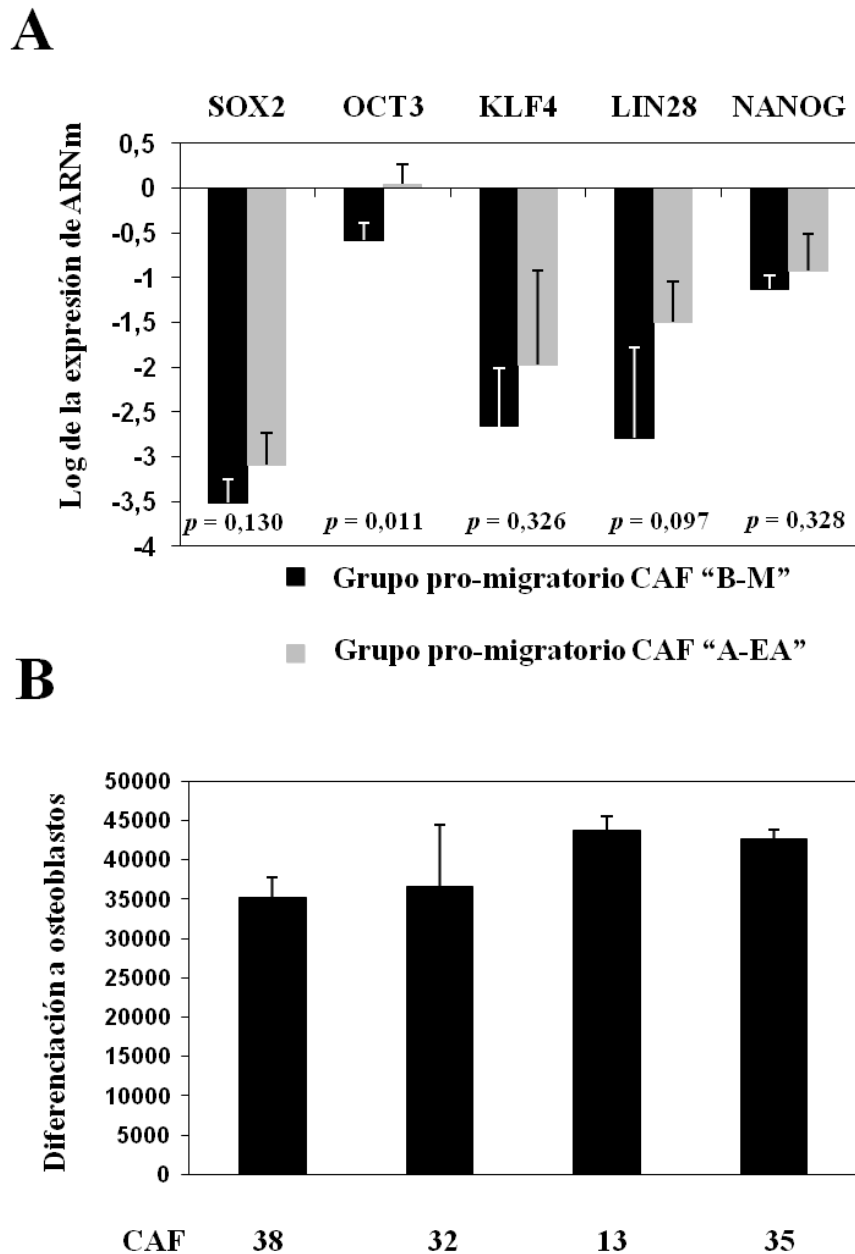


Figura 12. Análisis de la pluripotencia de los CAF. Se detectaron mayores niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia, cuantificados por RT-PCR, en la mayoría de los CAF más pro-migratorios. Sin embargo, sólo se detectó asociación estadística con los niveles de expresión OCT3, observándose esta misma tendencia con los niveles de expresión SOX2 y LIN28 (A). Aunque los CAF mostraron capacidad de diferenciación a osteoblastos, no se detectó ninguna asociación entre el grado de diferenciación de los CAF y los efectos paracrinos pro-migratorios derivados de los mismos (B).

2.5. Identificación de genes desregulados en los subtipos pro-migratorios de CAF

Para identificar diferencias entre fibroblastos con distintos efectos pro-migratorios sobre las células de cáncer de colon, se seleccionaron, al azar, CAF representativos de cada subtipo pro-migratorio para analizar los perfiles de expresión génica mediante arrays. Así, se emplearon cuatro muestras de ARNm de CAF de cada grupo pro-migratorio, Bajo (B, id = 28), Medio (M, id = 32), Alto (A, id = 13) y Extra-Alto (EA, id = 33), y dos líneas primarias de fibroblastos normales (FN, id = 36 y 13) como muestras control y de referencia.

Para determinar los genes diferencialmente expresados (DE) de los subtipos pro-migratorios de CAF, los datos fueron normalizados restando el valor promedio de expresión de las muestras de FN a los datos de las muestras de CAF de cada grupo pro-migratorio (B, M, A, EA).

El análisis de datos mostró que los subtipos de CAF clasificados como “B” y “M” se aunaban en un subgrupo y los subtipos “A” y “EA” en otro. Por lo tanto, se consideraron los tipos B y M (BM) como muestras replicadas de un mismo grupo y los tipos A y EA (AEA) también como réplicas de otro grupo (Figura 13 A). Para determinar los genes DE, se utilizó el test estadístico ANOVA considerando el valor de p inferior a 0,05 como punto de corte, y el incremento Log2 como punto de corte en “0.5”.

Las diferencias de la expresión génica de los genes DE entre los grupos de CAF “BM” y “AEA” dieron lugar a un “perfil génico” constituido por genes alterados significativamente entre los grupos de CAF más y menos pro-migratorios. Para determinar este perfil se analizaron los valores de expresión normalizados con el test ANOVA (p-valor inferior a 0,05). Posteriormente, una serie de 232 pacientes se clasificó en función de este perfil de expresión génica para estudiar su valor pronóstico.

2.6. Rutas desreguladas en los grupos pro-migratorios de CAF

Para determinar las rutas celulares en las que están implicados los genes DE entre los grupos BM y AEA, se realizó el análisis Gene Ontology Biological Process (GOBP) con estadística binomial.

Las rutas GOBP desreguladas entre los distintos grupos pro-migratorios de CAF se muestran en la Figura 13 B. Se observaron genes DE en el módulo GOBP “*proteínas de direccionamiento a Golgi*” entre los distintos CAF. Así, los genes implicados en los procesos relacionados con el aparato de Golgi se encontraban disminuidos en el grupo “BM”, mientras que los mismos genes sobre-expresados estaban enriquecidos en el grupo “AEA”.

Asimismo, los genes DE en la categoría GOBP “*regulación negativa de la producción de citoquinas*” estaban disminuidos en el grupo “AEA”. Además, la señalización de p53 y otros procesos biológicos relacionados con la apoptosis y la muerte celular, tales como “*transducción de la señal mediante p53*”, “*inducción de genes de apoptosis*” o “*procesos de apoptosis*”, estaban también disminuidos en el grupo “AEA”.

Por último, distintos módulos GOBP relacionados con la respuesta inmune, estaban también disminuidos en el grupo “AEA”, como las “*vías relacionadas con la señalización Toll*”, la “*regulación de la respuesta inmune innata*”, la “*respuesta celular al interferón-gamma*” y la “*regulación de la producción del interferón tipo I*” (Figura 13 B).

En términos generales, el análisis de la ontología de genes reveló que los genes DE en los CAF representan funciones o procesos de gran relevancia para el microambiente del tumor como los reguladores de la producción de citoquinas o la modulación del sistema inmune.

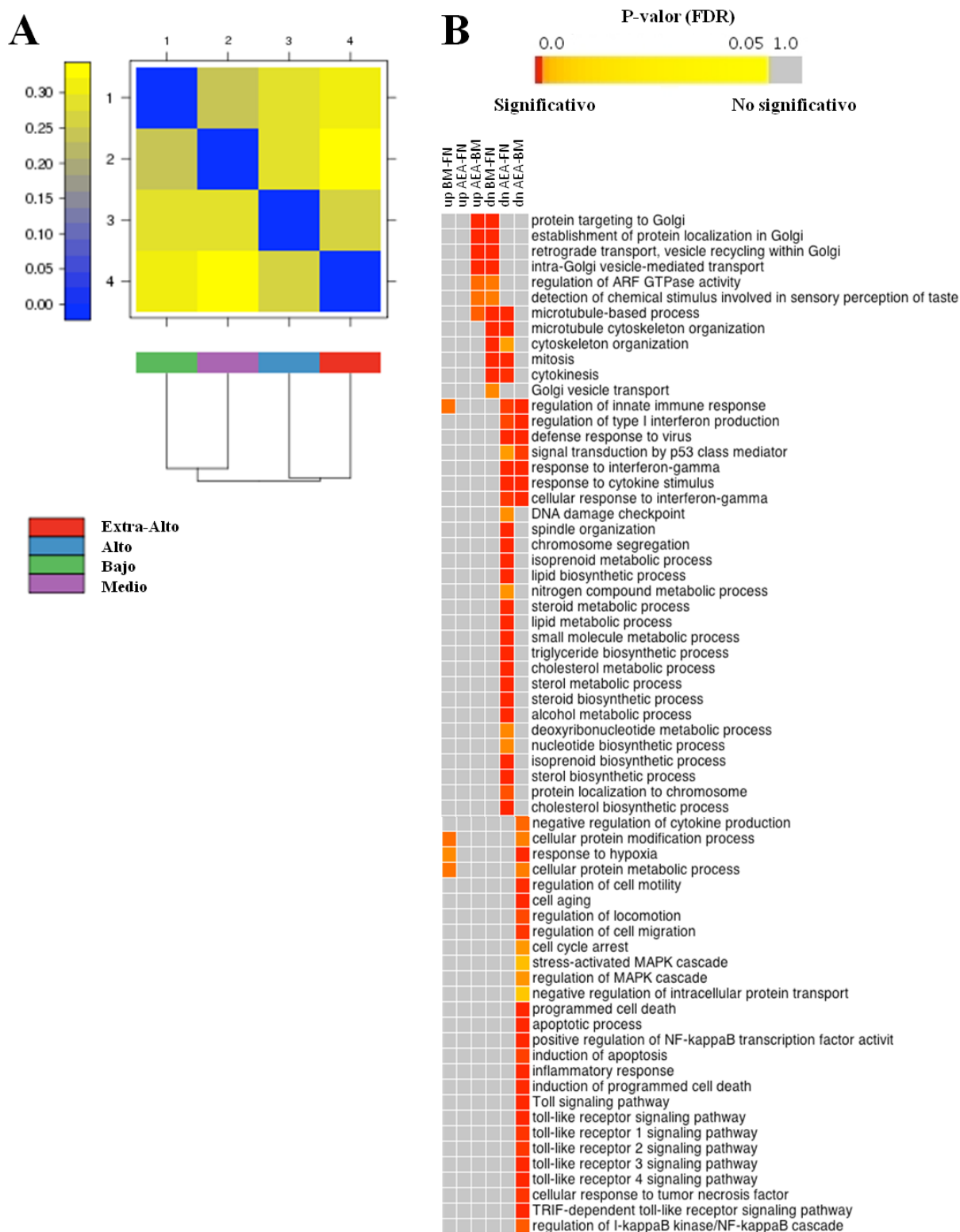


Figura 13. Agrupación de los CAF y análisis de enriquecimiento funcional de genes DE. Mapa de color que representa las distancias entre arrays (muestras de CAF) (A). La escala de color fue elegida para cubrir el rango de distancias encontradas en el conjunto de datos. Los patrones indican agrupamiento de las matrices con similitudes biológicas. Considerando los valores de expresión de las 4 muestras, la distancia de similitud entre matrices se calculó con el programa arrayQualityMetrics (ver Metodología). Análisis GOBP en diferentes condiciones experimentales (B). Las columnas representan diferentes comparaciones entre dos condiciones experimentales. Considerando los genes DE en estas condiciones, el resultado del análisis funcional se muestra en filas en base al código del mapa de color. Los colores representan los valores p corregidos (FDR). El color rojizo indica un valor de p más significativo, mientras que el amarillo uno menos significativo y el gris, no significativo.

2.7. El perfil génico de CAF más pro-migratorios es un marcador de mayor agresividad tumoral en pacientes con CC

Para evaluar la relevancia clínica del “perfil génico” de los CAF más pro-migratorios, se estudió su asociación con la supervivencia de los pacientes con CC de una base de datos de expresión génica como ha sido descrito en la sección de Metodología. Usando el software “GiTools” (Pérez-Llamas C y López-Bigas N, 2011), se determinó el valor *z*-score para los genes del perfil CAF en los distintos pacientes, de manera que éstos se dividieron en dos grupos en función de su puntuación obtenida para el valor *z*, el cual indica un nivel de expresión significativamente más alto o más bajo de los genes del perfil CAF. Esta clasificación permitió realizar el análisis Kaplan-Meier considerando la información clínica de los pacientes y así determinar la relevancia del “perfil génico” de los CAF en el pronóstico de la enfermedad. En la Figura 14 A se muestra un mapa de color en el que aparecen los 50 genes más relevantes de la firma.

El análisis de supervivencia mostró un riesgo superior de recidiva en aquellos pacientes con puntuaciones *z* altas (HR = 2,2, IC: 1.2 a 4.1) (Figura 14 B). Del mismo modo, se observó una tendencia a la asociación estadística para la SG (HR = 1,8, IC: 1,0 a 3,3) (Figura 14 C). Por lo tanto, utilizando una base de datos independiente de CC, los pacientes con un patrón de expresión similar a la firma CAF mostraron supervivencias más cortas.

A continuación, el valor pronóstico del “perfil génico” de los CAF se analizó en función del estadio tumoral. El análisis reveló que el perfil génico tiene valor pronóstico en las etapas avanzadas de la enfermedad (estadios III y IV) para la SLE y la SG, pero no en estadios tempranos (Figura 14 D, E). Por lo tanto, el perfil estudiado se comporta como una variable predictiva en el pronóstico de la supervivencia en etapas avanzadas de la enfermedad.

En resumen, estos análisis demuestran que la expresión del “perfil génico” de los CAF más pro-migratorios es un marcador de mal pronóstico en pacientes con CC, sobre todo en aquellos que se encuentran en estadios avanzados.

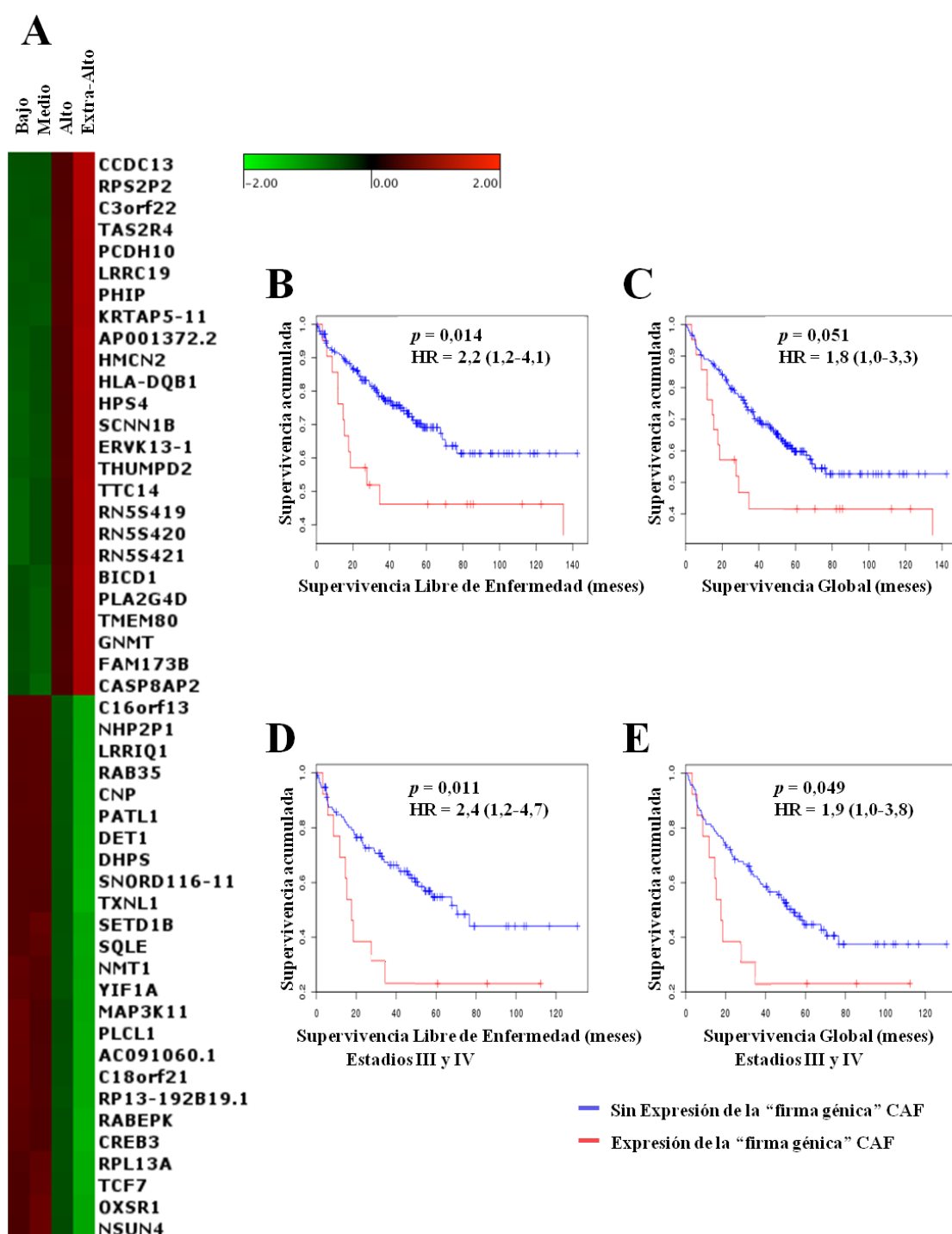


Figura 14. Perfil génico de los CAF y su valor predictivo sobre la supervivencia en pacientes con CC. Mapa de color en el que se representan los 25 genes más sobre-expresados y los 25 más disminuidos del “perfil génico” de los CAF (A). Supervivencia de los pacientes con alta y baja expresión del “perfil génico” de los CAF (los pacientes han sido agrupados en función de su puntuación z obtenida). El cálculo del Hazard Ratio (HR) se basó en el análisis de Cox (B, C). Del mismo modo, se comprobó el valor pronóstico del perfil CAF según el estadio tumoral de los pacientes con el análisis de Kaplan-Meier. Las muestras de pacientes se agruparon en estadios I-II y III-IV (D, E), según la información proporcionada por los autores de estas bases de datos públicos.

2.8. Validación del perfil génico de los CAF como genes con valor informativo de la supervivencia de los pacientes con CC

En primer lugar, se confirmó mediante RT-PCR la desregulación de 7 genes elegidos al azar del “perfil génico” de los CAF (Figura 15).

Posteriormente, se seleccionó un set de 4 de estos 7 genes, IGBP3, OAS2, MX1 and ROBO2 para su validación como marcadores pronóstico en una serie independiente de pacientes con CC. Se analizaron por RT-PCR los niveles de expresión de ARNm de este set de genes en las muestras de tumores derivadas de 142 pacientes.

Los genes IGFBP3 y ROBO2 mostraron niveles de sobre-expresión, mientras que OAS2 y MX1 mostraron niveles disminuidos en el grupo “AEA” de CAF. Por lo tanto, se consideró expresión desregulada de estos genes en pacientes con altos niveles de expresión de IGFBP3 y ROBO2 o en pacientes con bajos niveles de expresión de OAS2 y MX1.

El análisis de supervivencia considerando cada gen de manera individual mostró diferentes asociaciones entre la expresión desregulada del ARNm y la SLE y SG de los pacientes. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en todos los casos (Figura 16).

No obstante, el “perfil génico” de los CAF incluye los niveles de expresión de muchos genes. Por lo tanto, se combinaron los niveles de expresión de ARNm del set de estos cuatro genes para estudiar su posible efecto aditivo en la supervivencia de los pacientes. Así, se detectó una asociación estadística entre la combinación de la expresión génica del set de cuatro genes y la SLE y la SG de los pacientes con CC (Figura 17 A, B).

En suma, estos resultados apoyan el valor pronóstico del “perfil génico” de los CAF de la supervivencia de los pacientes con CC.

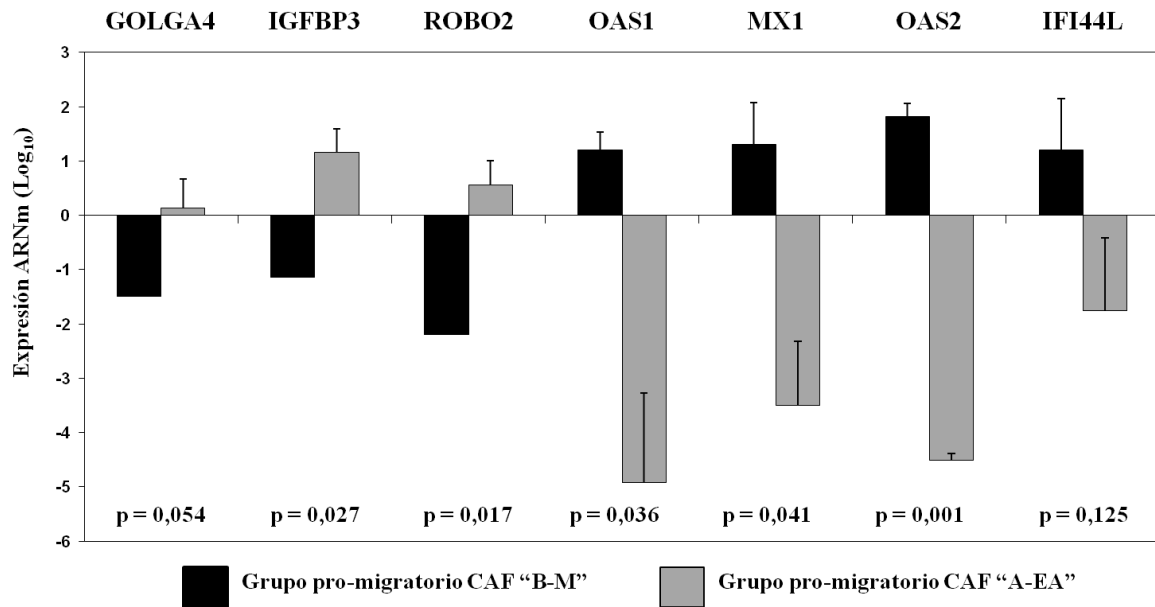
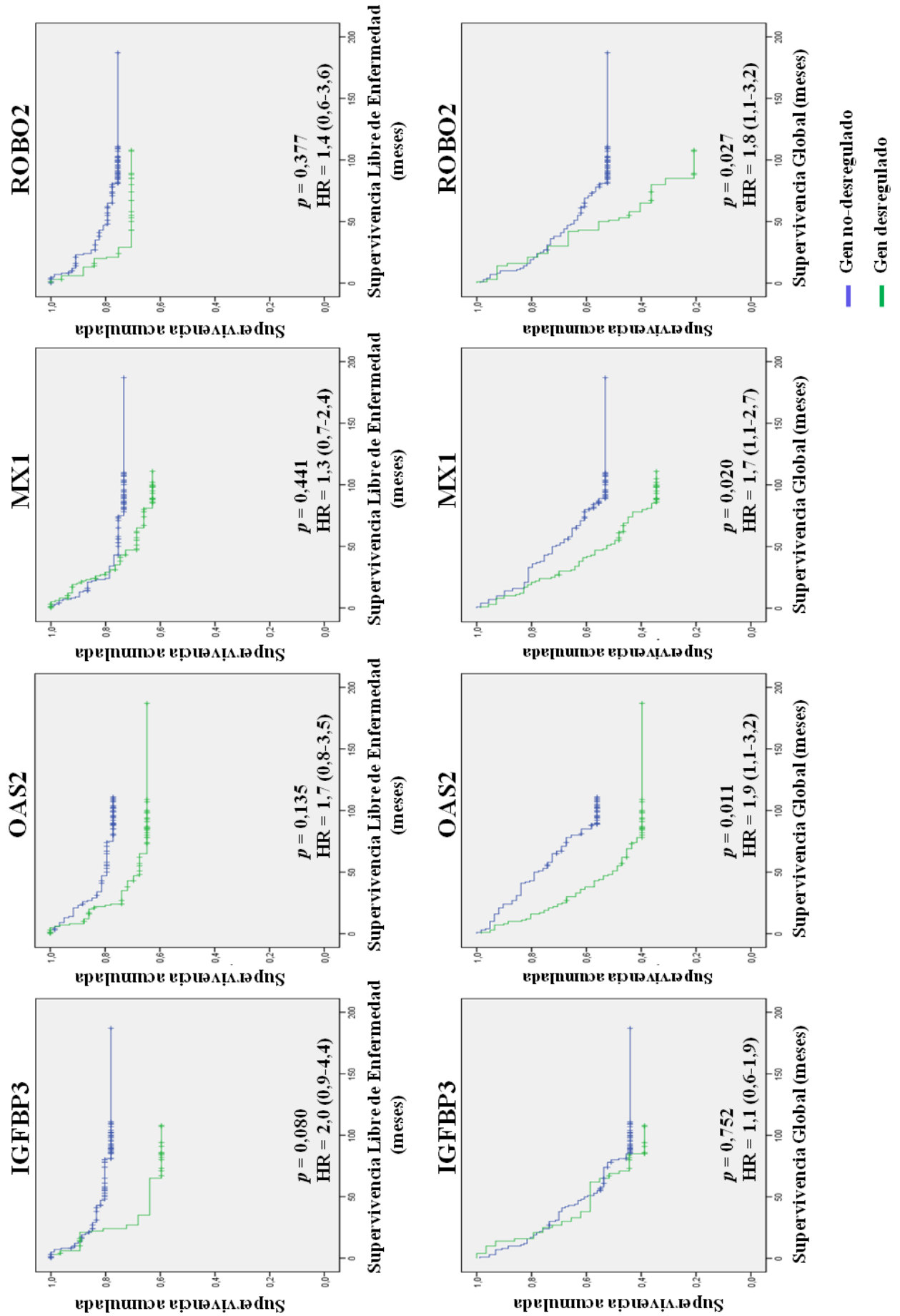


Figura 15. Validación de los genes desregulados en los CAF mediante RT-PCR. Los niveles de expresión de ARNm de 7 genes seleccionados al azar incluidos en el “perfil génico” de los CAF se analizaron por RT-PCR. Seis de los siete mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ARNm entre los grupos pro-migratorios “BM” y “AEA”.

Figura 16. Análisis de expresión de genes seleccionados aleatoriamente de la “firma génica” de los CAF y su relación con la supervivencia de los enfermos. Análisis Kaplan-Maier y análisis Cox del Hazard Ratio (HR) entre los niveles de expresión de IGFBP3, OAS2, MX1 y ROBO2 y la SLE (A) y la SG (B) en pacientes con CC.



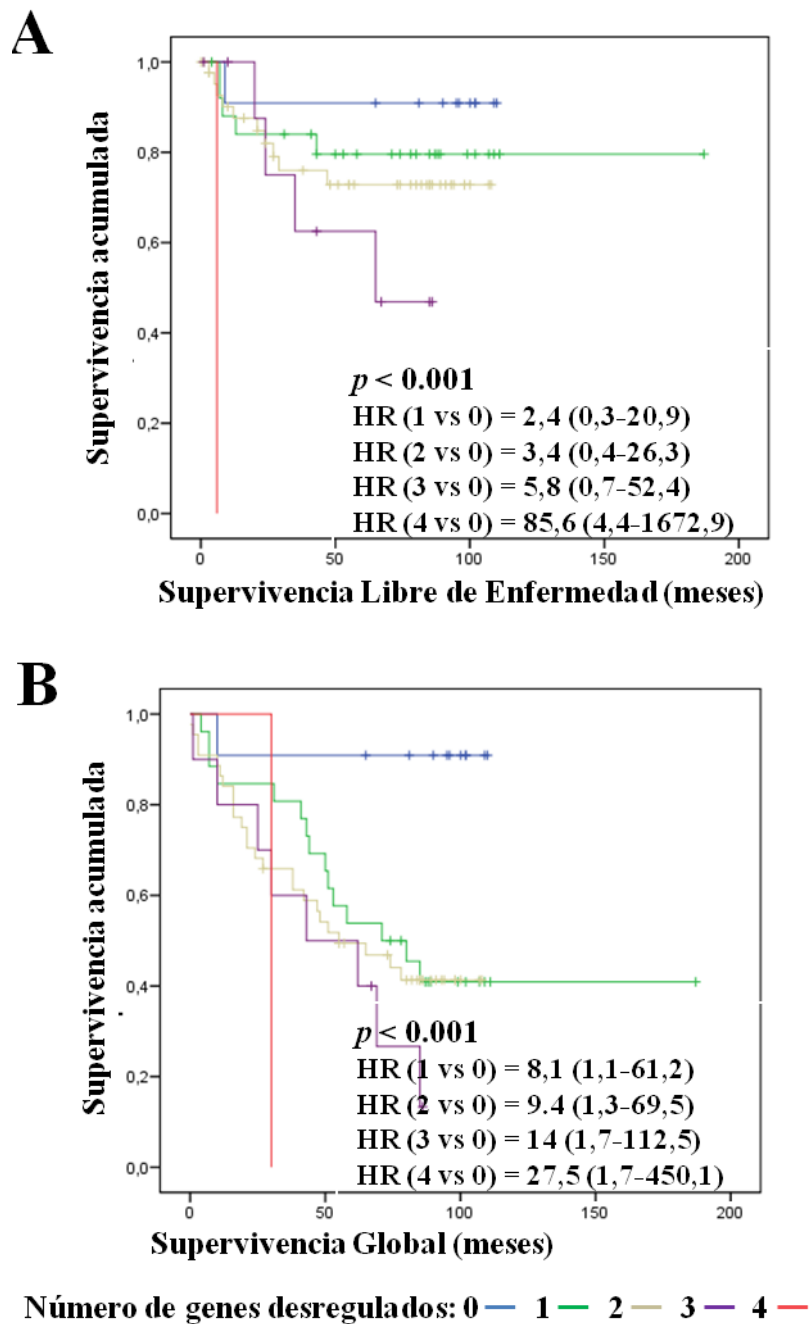


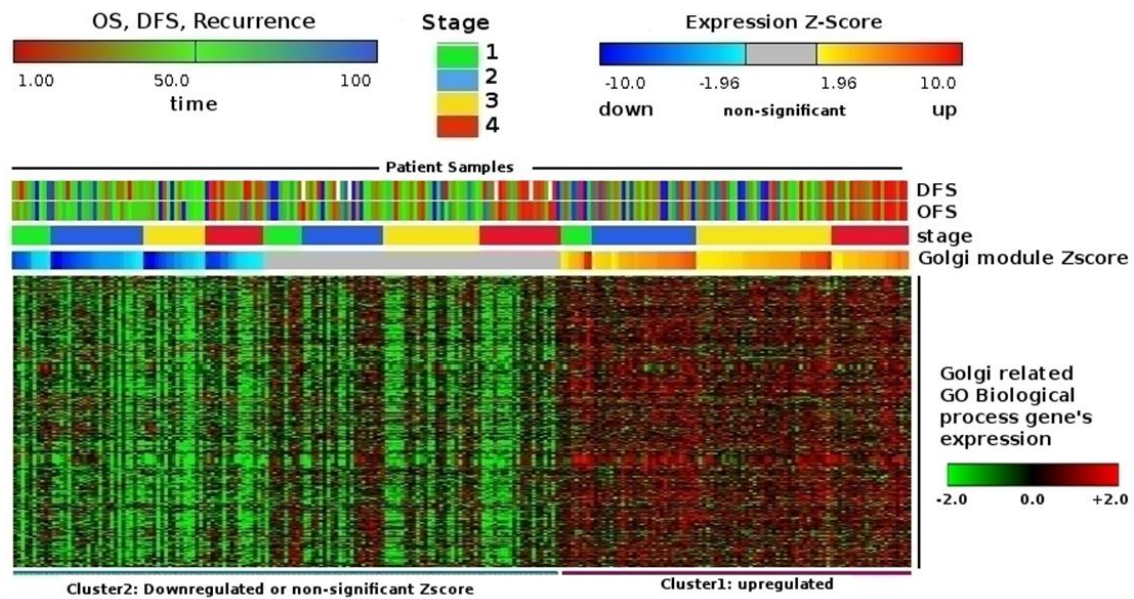
Figura 17. Combinación de genes de la “firma génica” de los CAF y su relación con la supervivencia. Asociación estadística entre la combinación de la expresión del set de 4 genes constituido por IGFBP3, OAS2, MX1 y ROBO2 y la SLE (A) y la SG (B) de los pacientes con CC.

2.9. La vía molecular Golgi también con valor pronóstico en pacientes con CC

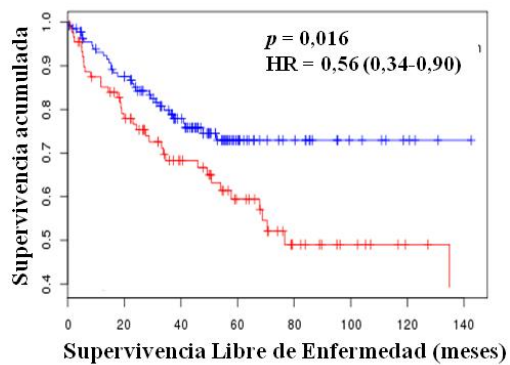
Dado que el análisis GOBP determinó una fuerte desregulación de genes pertenecientes al módulo “*proteínas de direccionamiento a Golgi*” entre los grupos pro-migratorios de CAF (Figura 13 B), se realizó un análisis de la expresión de estos genes en relación a la supervivencia de los pacientes con CC.

Los pacientes se clasificaron nuevamente en dos grupos en función de su valor z para los datos de expresión de los genes asociados con el aparato de Golgi y los procesos de GOBP relacionados (229 genes en total). Así, se consideraron los pacientes que mostraron mayor expresión de los genes relacionados con el módulo Golgi y los pacientes con menor expresión. Curiosamente, los genes relacionados con los procesos Golgi mostraron valor pronóstico para la SLE y la SG en pacientes con CC. Por lo tanto, como se muestra en la Figura 18, la supervivencia de los pacientes es más corta en aquellos con mayores niveles de expresión de los genes Golgi.

A



B



C

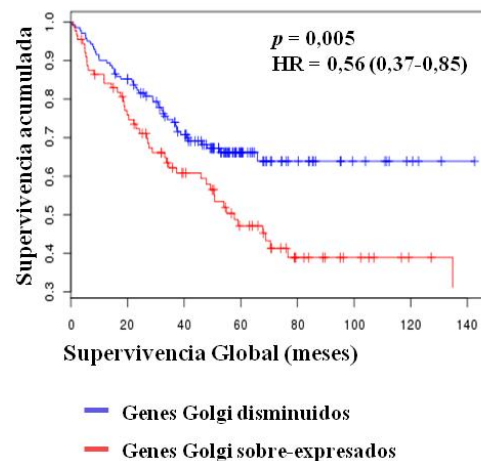


Figura 18. Expresión de los genes del módulo Golgi en pacientes con CC y su valor pronóstico. Mapa de color que representa la expresión los genes relacionados con los procesos del Golgi en pacientes con cáncer de colon. Las filas muestran los distintos genes del módulo Golgi y las columnas son los diferentes pacientes. El mapa de color del módulo de expresión de los genes del Golgi está agrupado en base a la significación más alta (>1.96 , grupo-1) o más baja (<1.96 , grupo-2) de la puntuación z. Además, los pacientes están agrupados en base al estadio, y la SG y la SLE se muestran en una escala de color en la parte superior del mapa de color del módulo de expresión del Golgi (A). Las curvas Kaplan-Meier y análisis Cox del Hazard Ratio (HR) mostraron valor pronóstico de los niveles de expresión de los genes relacionados con los procesos del Golgi de la SLE y SG en pacientes con CC (B).

DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES CARACTERÍSTICOS DE ESTROMA ACTIVADO EN CÁNCER COLORRECTAL. VALOR APLICABLE

Existe una búsqueda constante de marcadores moleculares del cáncer colorrectal que puedan ser potencialmente útiles en el diagnóstico de la enfermedad, así como en el pronóstico, predicción de respuesta a tratamiento, seguimiento de pacientes sometidos a resección curativa y monitorización del tratamiento de la enfermedad avanzada. En los últimos años se han descrito numerosos marcadores en suero y en tejidos para cáncer colorrectal, aunque no se dispone de una evidencia suficiente para recomendar su uso clínico rutinario. El antígeno carcinoembrionario (CEA) es el más ampliamente utilizado en esta neoplasia, aunque entre sus limitaciones está una falta de sensibilidad y especificidad para la detección precoz del cáncer colorrectal, y una falta de producción de niveles séricos elevados en el 20-30% de pacientes con cáncer colorrectal a pesar de la presencia de enfermedad avanzada. Aún así, es conveniente su determinación preoperatoria ya que puede proporcionar información pronóstica (Duffy y col., 2003).

En las últimas décadas se ha demostrado la importancia del microambiente tumoral en el crecimiento y evolución del tumor (Bissell y Radisky, 2001, Li *et al.*, 2007, Augsten *et al.*, 2010). De manera que el conocimiento de su proceso de activación y la caracterización molecular de las intercomunicaciones entre células tumorales y estromales podrían ser útiles en la identificación de nuevos marcadores con valor pronóstico y nuevos blancos para la acción de antitumorales, utilizando como diana células en las que el nivel de mutaciones es presumiblemente mucho menor que en las células tumorales y por tanto menos proclives al desarrollo de resistencias. Por lo tanto, la modificación del estroma mediante tratamientos clínicos podría mejorar la supervivencia de los pacientes.

Los CAF contribuyen al crecimiento permisivo del tumor y los macrófagos M2 tienen funciones inmunosupresoras y favorecen la progresión tumoral, incluyendo la función pro-metastásica por la producción de factores angiogénicos y de degradación de la matriz extracelular (Orimo y Weinberg, 2006; Allavena *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2008). En la actualidad, se conocen algunos pasos involucrados en la comunicación entre estas células, no obstante, ampliar su conocimiento podría sentar las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento que podrían ser utilizadas para controlar la enfermedad.

Aunque existen algunas evidencias de que los marcadores de CAF estudiados en este trabajo tienen valor pronóstico de manera individual (Kwak *et al.*, 2010; Tsujino *et al.*, 2007; Henry *et al.*, 2007), se conoce muy poco acerca del valor pronóstico de los marcadores de macrófagos M2. De hecho, se ha descrito que la infiltración de los macrófagos en varios tipos de cáncer se asocia con peor pronóstico (Salvesen *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 1999; Leek *et al.*, 1996). Pero a la vez, también se ha determinado que una mayor abundancia de macrófagos en tumores de colon se asocia con un pronóstico más favorable (Augsten *et al.*, 2010). Puede que estos datos aparentemente contradictorios puedan ser esclarecidos con marcadores específicos de macrófagos M1 y M2. Así, en nuestro estudio hemos observado que niveles altos de expresión de ARNm de los marcadores de expresión de CAF se asocian estadísticamente con SLE y SG más cortas, y al incluir en el análisis de supervivencia los marcadores M2, esta relación se hace más robusta. Por otra parte, el análisis multivariante demuestra claramente que la variable que considera ambos tipos de marcadores, es un marcador pronóstico individual estadísticamente más fuerte que los marcadores de CAF o los marcadores M2 por separado.

Estudios anteriores han identificado diferencias entre estadios patológicos de cánceres gastro-intestinales o entre fibroblastos normales y tumorales en CC. Sin embargo, estos estudios no valoran la relevancia clínica del perfil de expresión génica del estroma en el pronóstico de los pacientes (Saadi *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2010). Los resultados de nuestro estudio podrían tener impacto en la práctica clínica, ya que son útiles para la identificación de pacientes con peor pronóstico. Además, describen la existencia de una interacción entre la expresión de los marcadores de CAF y de macrófagos M2 y el estadio patológico de los tumores analizados. De esta manera y como muestra el análisis multivariante, el valor pronóstico para la SG de los marcadores analizados es más fuerte en etapas avanzadas de la enfermedad. Hoy en día, las terapias disponibles basadas en quimioterapia e inmunoterapia, administradas como tratamiento adyuvante en el estadio III o cuando la enfermedad es metastásica, han aumentado tanto la SLE y como la SG en los pacientes con CC lo que ha hecho posible estudiar la relación positiva de los marcadores del estroma analizados y la supervivencia de los pacientes en etapas avanzadas. En este contexto, puede ser que el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a los componentes del microambiente pueda mejorar el tratamiento médico de estos pacientes, especialmente en aquellos con peor evolución.

En nuestro trabajo no hemos encontrado asociación entre los marcadores de CAF y de macrófagos M2 y el pronóstico en pacientes con cáncer de recto. Estos pacientes representan el grupo más pequeño en nuestra cohorte de individuos (16%) y los resultados obtenidos pueden deberse simplemente a un efecto aleatorio. Sin embargo, también es posible que los tumores de recto se desarrollen de manera diferente a los tumores de colon. Por otro lado, en el tratamiento del cáncer de recto existen modificaciones con respecto al tratamiento tradicional del cáncer de colon, administrándose radioterapia y quimioterapia conjuntamente antes de la cirugía. No obstante, los carcinomas rectales de nuestra serie recibieron tratamiento adyuvante después de la operación, lo que nos permitió obtener muestras representativas del tumor para su estudio. En consecuencia, nuestros resultados podrían sugerir que la radioterapia tras la cirugía en los carcinomas rectales puede modificar la evolución de la enfermedad y, por lo tanto, el valor informativo de los marcadores moleculares estudiados. También es posible que en los carcinomas rectales, el componente del estroma tenga una importancia biológica distinta, pudiendo tener los fibroblastos y los macrófagos M2 funciones diferentes a las observadas en los carcinomas de colon.

2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMORES Y PERFIL GÉNICO CON VALOR DISCRIMINATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL

Estudios previos han determinado en varios tipos de tumores que los fibroblastos primarios normales y tumorales tienen distintos perfiles de expresión génica. Así, en cáncer de mama se han descrito diferencias entre CAF y FN y también entre CAF procedentes de distintos subtipos clínicos (Sadlonova *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2010; Tchou *et al.*, 2012). En el caso del cáncer de pulmón de célula no pequeña, se han observado diferencias en la expresión de genes relacionados con la vía de señalización TGF β entre fibroblastos normales y tumorales (Navab *et al.*, 2011). Asimismo, en cáncer de próstata, también se han encontrado diferencias en los perfiles de expresión génica de fibroblastos prostáticos normales y asociados a tumores, no obstante, este estudio analizó un solo paciente mediante la técnica Tag profiling (Orr *et al.*, 2012). En cáncer oral escamoso, se han identificado firmas génicas que caracterizan CAF procedentes de tumores genéticamente estables e inestables, y también de fibroblastos derivados de la mucosa normal oral (Lim *et al.*, 2011). Por último, se han determinado distintos perfiles de expresión de micro ARNs en CAF en relación con FN en cáncer de endometrio y de vejiga (Aprelikova *et al.*, 2010; Enkelmann *et al.*, 2011).

Además, estudios más recientes han tratado de identificar subpoblaciones de CAF funcional y molecularmente distintas. Así, en cáncer oral escamoso se han descrito dos subpoblaciones de CAF con distintas capacidades pro-tumorogénicas (Costea *et al.*, 2013). En el caso del cáncer de próstata también se han caracterizado dos subtipos de CAF en función de su respuesta a TGF- β y su contribución a la progresión tumoral (Kiskowski *et al.*, 2011).

En el caso del cáncer de colon, las diferencias entre los fibroblastos normales y tumorales no han sido estudiadas en profundidad. No obstante, existen algunos trabajos, como el de Nakagawa H *et al.*, que ha determinado *in vitro* los distintos efectos pro-tumorogénicos sobre células cancerosas de colon de fibroblastos asociados a metástasis en hígado, fibroblastos normales de hígado alejados de lesiones metastásicas y fibroblastos de piel en tres pacientes con cáncer de colon metastásico. Además, en este trabajo se contrasta el perfil de expresión molecular de los fibroblastos asociados a metástasis en relación a los fibroblastos de piel (Nakagawa *et al.*, 2004). Por otra parte,

en otro trabajo se han identificado los patrones de expresión proteica que diferencian los CAF de los FN adyacentes al tumor de pacientes con cáncer de colon (Wang ZH *et al.*, 2012). Existe además el estudio de Berdiel-Acer *et al.*, que determina que el medio condicionado derivado de los CAF procedentes de metástasis hepáticas de colon favorece la migración y la invasión de las células tumorales de manera más notable que el de los fibroblastos normales o procedentes del tumor primario. En estos trabajos se describen diferencias entre fibroblastos normales y asociados a tumores o la influencia de sus medios condicionados, pero no se realiza ningún estudio clínico para reforzar sus conclusiones o para conocer el valor pronóstico de estas diferencias entre fibroblastos ni tampoco se analizan diferencias funcionales o moleculares entre CAF de diferentes pacientes o intratumorales.

En este contexto, nuestro trabajo identifica por primera vez diferentes subtipos de CAF primarios en pacientes con CC. Para ello, los distintos CAF primarios se clasificaron funcionalmente en base a su capacidad para promover la migración de células tumorales, sus características de activación y sus distintos perfiles de expresión molecular. Curiosamente, se observó una asociación entre la expresión de marcadores de pluripotencia en los CAF y su efecto pro-migratorio en las células tumorales. Además, la relevancia clínica de este trabajo viene dada por la definición de una firma génica, derivada de los CAF más pro-tumorigénicos respecto a los menos pro-tumorigénicos, con valor pronóstico en la evolución de los pacientes de cáncer de colon.

Así, este es el primer estudio que determina el impacto pro-migratorio de CAF primarios de colon procedentes de diferentes pacientes sobre las células cancerosas, demostrando además que sus efectos son mucho más notables que los inducidos por los FN. Al mismo tiempo, los experimentos de migración se han validado en dos líneas celulares tumorales lo que sugiere que los efectos pro-migratorios de los CAF no se limitan a una línea celular en particular. Igualmente, la caracterización fenotípica de marcadores de fibroblasto activo en los CAF, estudiados mediante tinción de α -SMA y la capacidad de contracción de geles de colágeno, sugiere una relación entre los distintos estados de activación de estos fibroblastos y su potencial para promover la tumorigénesis. En términos generales, se considera que los CAF colectivamente comparten el mismo nivel de activación, no obstante, la expresión particular de

marcadores de activación, como son α -SMA, FSP1, FAP y otros, puede variar (Cirri y Chiarugi, 2012). Apoyando nuestros datos, un estudio reciente ha determinado que el silenciamiento del gen FAP en CAF favorece la reducción del crecimiento de tumores *in vivo* y la tumorigénesis en cáncer de ovario. Además, también se observó que la inhibición de este gen y sus efectos están mediados por la disminución de las propiedades de pluripotencia en los CAF (Lai *et al.*, 2012). Por lo tanto, no se descarta que la pluripotencialidad en estos fibroblastos pueda determinar sus capacidades pro-tumorigénicas. En la misma línea, nuestro estudio describe resultados, que aunque preliminares, muestran una asociación entre los marcadores de pluripotencia en los CAF y sus habilidades pro-migratorias sobre las células tumorales. Además, los ensayos de diferenciación a osteoblasto demuestran la capacidad de diferenciación de los CAF como característica de su pluripotencialidad. No obstante, en nuestro trabajo no hemos encontrado una correspondencia entre las capacidades de diferenciación de los CAF y su efecto pro-migratorio en células cancerosas. Por lo tanto, es necesario profundizar en estos estudios dirigiendo la experimentación a la caracterización de la pluripotencialidad en los CAF y considerando la posibilidad de que las habilidades pro-migratorias puedan estar relacionadas con un fenotipo pluripotente no diferenciado.

Los CAF son poblaciones heterogéneas y su composición relativa difiere en gran medida entre distintos tumores, dentro de un determinado tipo de tumor e incluso entre tumores individuales (Worthley *et al.*, 2010). Esta notable heterogeneidad en los CAF puede deberse a su posible origen diverso. Así, se ha descrito que los CAF pueden derivar de fibroblastos residentes, de células progenitoras derivadas de la médula ósea, de células endoteliales o tumorales a través de la transición endotelio/epitelio-mesénquima, y también de células de músculo liso, pericitos, adipocitos o células inflamatorias (Allen y Louise, 2011). Por lo tanto, se debe profundizar en el análisis de las habilidades pro-migratorias de las diferentes poblaciones de CAF considerando la procedencia variada de estas células.

El análisis ontológico de genes en los subtipos de CAF destacó funciones o procesos de relevancia en el microambiente tumoral, incluyendo la regulación de la producción de citoquinas o la modulación del sistema inmune. De esta forma, es destacable en los CAF más pro-tumorigénicos la disminución en la expresión de genes relacionados con la "*regulación negativa de la producción de citoquinas*", lo que sugiere que estos genes

podrían estar desactivados y por lo tanto, este subtipo de CAF produciría mayores cantidades de citoquinas liberadas al estroma. La reducción de la expresión de genes reguladores de vías relacionadas con la respuesta inmune caracteriza también los CAF más pro-tumorigénicos, lo que podría estar relacionado con la supresión de la respuesta inmune inducida por el tumor primario. Por último, los genes relacionados con la transducción de la señal p53 y otros procesos biológicos relacionados con la apoptosis y la muerte celular se encuentran también disminuidos en este grupo de fibroblastos, lo cual puede deberse al permanente estado de activación de estas células.

En paralelo, también se observaron diferencias en la vía relacionada con "*proteína de direccionamiento de Golgi*" entre los subtipos de CAF. En línea con los datos presentados, estudios recientes han confirmado que la sobre-expresión de proteínas del Golgi en células cancerosas, como la fosfoproteína Golgi 3, está asociada a la proliferación y la tumorigenicidad (Hua *et al.*, 2012; Kunigou *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Wang JH *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2012). Asimismo, la descripción de la red molecular que conecta el aparato de Golgi a otros orgánulos, demuestra su función esencial en diferentes actividades celulares, indicando su posible relevancia en tumores de próstata (Migita y Inoue, 2012). Igualmente, en la enfermedad inflamatoria del intestino, la alteración de la glicosilación en el aparato de Golgi puede ser un factor implicado en el desarrollo del cáncer de colon (Campbell *et al.*, 2001).

Existen estudios previos que han identificado firmas génicas en CAF de distintos tumores en relación a los FN asociadas a un peor pronóstico del paciente. Así, en cáncer de pulmón de célula no pequeña, el análisis del perfil génico de CAF y FN, identificó un subconjunto de genes DE con valor pronóstico en un estudio realizado sobre bases de datos de expresión de cáncer de pulmón públicas (Navab *et al.*, 2011). En el carcinoma oral de células escamosas, la firma de expresión génica de fibroblastos procedentes de tumores genéticamente inestables se asoció con peor pronóstico en una base independiente de datos de cáncer de cabeza y cuello (Lim *et al.*, 2011). En células del estroma tumoral de esófago de Barret aisladas por microdissección láser, se determinó una firma de genes capaz de discriminar tumores pre-invasivos de invasivos en tumores digestivos, incluyendo el cáncer de colon. No obstante, el valor pronóstico de esta firma de estroma no se confirmó en ningún tipo tumoral (Saadi *et al.*, 2010).

Los datos presentados en nuestro estudio destacan por la importancia clínica de la firma molecular específica de los CAF en cáncer de colon. Apoyando este hallazgo, además hemos detectado una asociación entre los niveles de expresión de un set de cuatro genes, incluidos en la firma, con valor pronóstico en una serie de 142 pacientes de colon. Debido a la falta de datos de expresión públicos que consideren el ratio estroma/epitelio, la base de datos empleada en nuestro trabajo corresponde a la expresión del tejido tumoral total, en contraste con la firma génica obtenida en nuestro estudio a partir de fibroblastos asociados a tumores. Por lo tanto, se hace necesaria la determinación de la contaminación epitelial. Así, hemos realizado un estudio preliminar con los CAF y sus respectivas muestras de tejido tumoral, pero no hemos obtenido resultados concluyentes (no se muestran los datos), ya que habría que analizar un mayor número de muestras. Aunque este punto podría ser una limitación del estudio, el análisis “*in silico*” en una base de datos independiente de pacientes con CC confirmó el valor pronóstico de la firma génica de los CAF más pro-tumorogénicos. De forma similar se han llevado a cabo los estudios anteriormente comentados en los que se ha determinado el valor pronóstico de la firma génica de los CAF en relación a los FN (Navab *et al*, 2011; Lim *et al*, 2011).

Por otro lado, la firma molecular obtenida es una variable predictiva más destacable en estadios avanzados de los pacientes. Por lo tanto, los resultados confirman que el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a los componentes del microambiente, ayudaría a mejorar el tratamiento clínico de los pacientes con peor pronóstico. Por último, destacar que se hace necesaria una caracterización más profunda de los efectos de los procesos Golgi en los tumores de colon ya que el análisis ontológico de genes resaltó su implicación determinándose además su valor pronóstico en la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon.

3. POTENCIAL DE APLICABILIDAD

La investigación biomédica es imprescindible para la generación de conocimiento científico-técnico sobre los procesos celulares y moleculares. Esta constante innovación produce un flujo de nuevos datos y conceptos que, de forma específica, conllevan su propia capacidad de aplicación y valor clínico.

En este contexto, este estudio, mediante su doble objetivo principal ha confirmado, por una parte, que la sobreexpresión de una serie de marcadores de estroma activado, no específicos de célula tumoral, están relacionados con la evolución de los pacientes y, en segundo lugar, el papel modificador que sobre el tumor puede ejercer la célula predominante del estroma tumoral o CAF.

El primer grupo de resultados determina que dos marcadores específicos de macrófagos M2 presentes en los tumores, en este caso en carcinomas de colon, y otros tres característicos de CAF, pueden definir subgrupos de pacientes con evoluciones diferenciales. Hemos demostrado que en relación con el parámetro supervivencia de los pacientes, que es la variable clínica mas consistente en oncología, ya que en ella confluyen todos los factores asociados al tumor, al enfermo y al tratamiento, el estado de expresión de estos marcadores puede informar sobre la supervivencia global y libre de enfermedad de los pacientes. El interés aplicado de estos resultados se basa en que podemos obtener datos sobre el comportamiento de los carcinomas de colon, utilizando unos factores moleculares no específicos de sus células tumorales y por tanto menos mutables.

El segundo grupo de resultados obtenidos demuestra que estos fibroblastos activados, CAF, ejercen una serie de funciones pro-migratorias que favorecen la progresión del tumor pero son difíciles de visualizar en los tumores primarios y por tanto con un componente de aplicabilidad limitado. Sin embargo, otras características de las mismas como la sobreexpresión de un conjunto de genes presentes en los CAF, mas fácilmente determinable, pueden ser utilizados como indicadores de una mayor agresividad de los tumores y, al mismo tiempo, informarnos que la supervivencia de estos pacientes es más corta.

En este estudio no se ha analizado la influencia que todos estos cambios en el estado de expresión génica pueden tener sobre el tratamiento, ni se ha explorado qué oportunidad ofrecería la inhibición de alguna de estas funciones de los CAF como estrategia terapéutica. Sin embargo, es razonable considerar que, al margen de los tratamientos citotóxicos y citostáticos contra la célula tumoral, una actuación sobre el espacio celular normal de los tumores, similar al que ofrecen los antiangiogénicos, podría tener un efecto aditivo o sinérgico con el tratamiento antitumoral hoy disponible. En este sentido consideramos que este trabajo aporta resultados que pueden abrir nuevas líneas de investigación dirigidas al control, con finalidad terapéutica, de algunos de los fenómenos descritos.

CONCLUSIONES

A. La expresión de marcadores característicos de CAF, α -SMA, FSP1 y FAP, así como la de macrófagos M2, DCSIGN y CD163, se relacionan con la supervivencia de los pacientes de cáncer de colon, particularmente en los que están en etapas avanzadas.

Hallazgos concretos:

1. Existe una correlación directa entre la expresión de ARNm de los marcadores de CAF y de macrófagos M2, excepto para FAP y DCSIGN.
2. Los niveles de ARNm de CD163, α -SMA y FSP-1 y la variable, recidiva de los pacientes, presentan una asociación estadísticamente positiva, así como la expresión de CD163 y la variable *exitus* de los pacientes. El resto de variables clínico-patológicas analizadas de nuestra serie no se asocia con la expresión de los marcadores de estroma estudiados.
3. Los niveles de expresión de proteína y ARNm en muestras de tejido tumoral y normal de los marcadores FSP1 y FAP se asocian estadísticamente. También se observa una misma tendencia para el resto de marcadores de CAF y M2 estudiados.
4. Los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de CAF y de M2, considerados de manera conjunta, constituyen un indicador con mejor valor pronóstico que los mismos evaluados de manera individual.
5. Existe una interacción entre los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de CAF y de macrófagos M2 y el estadio patológico de los tumores analizados.
6. La relación positiva de los marcadores analizados y la supervivencia de los pacientes, es más evidente en aquellos en estadios avanzados de la enfermedad.
7. No existe asociación entre los marcadores estudiados y el comportamiento clínico en pacientes con cáncer de recto. Este hecho puede deberse a un posible efecto aleatorio, o a diferencias en el comportamiento biológico del estroma entre carcinomas rectales y de colon.

B. Los cambios de expresión génica en los fibroblastos asociados a tumores de colon influyen en la progresión de la enfermedad. Estos cambios definen una firma génica con claro valor informativo sobre la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon.

Hallazgos concretos:

8. El impacto pro-migratorio de CAF primarios de colon de diferentes pacientes sobre las células tumorales tiene un efecto mucho más notable que el inducido por los FN.
9. Existen diferentes subtipos de CAF en pacientes con carcinomas de colon. Así, los CAF pueden ser clasificados en base a su capacidad para promover la migración en células tumorales, sus características de activación y sus perfiles de expresión molecular.
10. Los distintos estados de activación de los CAF, cuantificados mediante la expresión de marcadores de fibroblasto activo y la capacidad de contracción de geles de colágeno, definen su potencial para promover la migración de células tumorales.
11. Los CAF presentan expresión de marcadores de pluripotencia y capacidad de diferenciación que podrían relacionarse con sus habilidades pro-migratorias sobre las células tumorales.
12. Los perfiles moleculares entre CAF más y menos pro-migratorios difieren claramente en un gran número de genes.
13. Los genes diferencialmente expresados entre los subtipos de CAF se asocian con funciones de importancia inmediata para el microambiente del tumor, incluyendo los procesos de red molecular del Golgi, la regulación de la producción de citoquinas, la modulación del sistema inmune, la transducción de la señal de p53, y otros procesos biológicos relacionados con la apoptosis y muerte celular.
14. La firma de expresión génica, derivada de los CAF más pro-migratorios respecto de los menos pro-migratorios, presenta claro valor informativo sobre la evolución de los pacientes de cáncer de colon, sobre todo en aquellos con estadios avanzados de la enfermedad.
15. Los genes IGBP3, OAS2, MX1 and ROBO2 presentan valor predictivo de supervivencia en pacientes con cáncer de colon en una serie externa de validación.
16. Los genes implicados en los procesos Golgi, también presentan valor predictivo de supervivencia de pacientes con CC.

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* 2003, 112: 1142-51.
- Achary S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 13629-13634.
- Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998, 58: 1149-1158.
- Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008, 222: 155-61.
- Allen M, Louise JJ. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 2011, 223: 162-176.
- Annibale B, Capurso G, Chistolini A, D'Ambra G, DiGiulio E, Monarca B, DelleFave G. Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms. *Am J Med* 2001, 111: 439-445.
- Aprelikova O, Yu X, Palla J, Wei BR, John S, Yi M, Stephens R, Simpson RM, Risinger JJ, Jazaeri A, Niederhuber J. The role of miR-31 and its target gene SATB2 in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 9: 4387-98.
- Arab L, Il'yasova D. The epidemiology of tea consumption and colorectal cancer incidence. *J Nutr* 2003, 133: 3310S-3318S.
- Augsten M, Hägglöf C, Olsson E, Stolz C, Tsagozis P, Levchenko T, Frederick MJ, Borg A, Micke P, Egevad L, Ostman A. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106: 3414-9.

- Augsten M, Hägglöf C, Peña C, Ostman A. A digest on the role of the tumor microenvironment in gastrointestinal cancers. *Cancer Microenviron* 2010, 3: 167-76.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001, 357:539-45.
- Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987, 56: 779-827.
- Bauer M, Su G, Casper C, He R, Rehrauer W, Friedl A. Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast. *Oncogene* 2010, 29: 1732-40.
- Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2005, 15: 329–41.
- Beck AH, Espinosa I, Edris B, Li R, Montgomery K, Zhu S, Varma S, Marinelli RJ, van de Rijn M, West RB. The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 778-87.
- Berdiel-Acer M, Bohem ME, López-Doriga A, Vidal A, Salazar R, Martínez-Iniesta M, Santos C, Sanjuan X, Villanueva A, Molleví DG. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts promote an adaptative response in colorectal cancer cells that inhibit proliferation and apoptosis: nonresistant cells die by nonapoptotic cell death. *Neoplasia* 2011 13:931-46.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003, 3: 401-10.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004, 432: 332-7.
- Biasco G, Paganelli GM, Brandi G, Santucci R, Lalli AA, Roncucci I, de Leon M, Miglioli M, Barbara L. Chemoprevention of colorectal cancer: role of antioxidant vitamins. *Eur J Cancer Prev* 1992, 3: 87-91.
- Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982, 99:31-68.
- Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001, 1: 46-54.

- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 2006, 107: 2112-22.
- Blansfield JA, Caragacianu D, Alexander HR 3rd, Tangrea MA, Morita SY, Lorang D, Schafer P, Muller G, Stirling D, Royal RE, Libutti SK. Combining agents that target the tumor microenvironment improves the efficacy of anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008, 14: 270-80.
- Boland CR, Kolars JC. Fiber and colon cancer: the weight of the evidence. *Gastroenterology* 1992, 103: 1964-1967.
- Boland CR. Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer* 1996, 69: 47-49.
- Boland CR. Understanding familial colorectal cancer-finding the corner pieces and filling in the center of the puzzle. *Gastroenterology* 2004, 127: 334-338.
- Bond JH. Screening for colorectal cancer. *Hosp Pract (Off Ed)* 1997, 32: 59-73.
- Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gaqneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 2004, 6: 97-105.
- Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, Harrington K, Williamson P, Moeendarbary E, Charras G, Sahai E. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2013, 15: 637-46
- Campbell BJ, Yu LG, Rhodes JM. Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: a possible role in cancer development. *Glycoconj J* 2001, 18: 851-8.
- Campbell I, Qiu W, Haviv I. Genetic changes in tumour microenvironments. *J Pathol*. 2011, 223: 450-8.

- Carethers JM, Hawn MT, Greenson JK, Hitchcock CL, Boland CR. Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998, 114: 1188-1195.
- Carson DJ, Santoro IM, Groden J. Isoforms of the APC tumor suppressor and their ability to inhibit cell growth and tumorigenicity. *Oncogene* 2004, 23: 7144-7148.
- Caspari R, Friedl W, Mandl M, Moslein G, Kadmon M, Knapp M, Jacobasch KH, Ecker KW, Kreissler-Haag D, Timmermanns G. Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 1994, 343: 629-632.
- Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* 2005, 310: 1504-10.
- Chen WJ, Ho CC, Chang YL, Chen HY, Lin CA, Ling TY, Yu SL, Yuan SS, Chen YJ, Lin CY, Pan SH, Chou HY, Chen YJ, Chang GC, Chu WC, Lee YM, Lee JY, Lee PJ, Li KC, Chen HW, Yang PC. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat Commun*, 2014, 5: 3472.
- Cirri P, Chiarugi P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012, 31: 195-208.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009, 30: 1073-81.
- Cooper GS, Yuan Z, Landefeld CS, Johanson JF, Rimm AA. A national population-based study of incidence of colorectal cancer and age. Implications for screening in older Americans. *Cancer* 1995, 75: 775-781.
- Costea DE, Hills A, Osman AH, Thurlow J, Kalna G, Huang X, Pena Murillo C, Parajuli H, Suliman S, Kulasekara KK, Johannessen AC, Partridge M. Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013, 73: 3888-901.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002, 420: 860-867

- De Wever O, Van Bockstal M, Mareel M, Hendrix A, Bracke M. Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2014, 25C: 33-46.
- De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 2004a, 18: 1016-8.
- De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, Bruyneel E, Mareel M. Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding. *J Cell Sci* 2004b, 117: 4691-703.
- Degen M, Brellier F, Schenk S, Driscoll R, Zaman K, Stupp R, Tornillo L, Terracciano L, Chiquet-Ehrismann R, Rüegg C, Seelentag W. Tenascin-W, a new marker of cancer stroma, is elevated in sera of colon and breast cancer patients. *Int J Cancer* 2008, 122: 2454-61.
- Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Pérez-Maceda B, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol* 2011, 186: 2192-200.
- Doucas H, Garcea G, Neal CP, Manson MM, Berry DP. Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance. *Eur J Cancer* 2005, 41: 365-79.
- Duffy MJ, Dalen AV, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *European Journal of Cancer* 2003, 39: 718-727.
- Duffy MJ, Dalen AV, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *European Journal of Cancer* 2003, 39: 718-727

- Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932, 35: 323-332.
- Dumont P, Berton A, Nagy N, Sandras F, Tinton S, Demetter P, Mascart F, Allaoui A, Decaestecker C, Salmon I. Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. *Lab Invest* 2008, 88: 896-906.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. Colon and rectum. eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 143-64.
- Eng C, Hampel H, de la Chapelle A. Genetic testing for cancer predisposition. *Annu Rev Med* 2001, 52: 371-400.
- Enkelmann A, Heinzelmann J, von Eggeling F, Walter M, Berndt A, Wunderlich H, Junker K. Specific protein and miRNA patterns characterise tumour-associated fibroblasts in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, 137: 751-9.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM; TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007, 356: 125-34.
- Fairweather D, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun* 2009, 33: 222-30.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, 61: 759-767.
- Fodde R, Smits RCH. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Rev Cancer* 2001, 1: 55-67.
- Freeman HJ. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2008, 14: 1810-1811.
- Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994, 331: 1669-1674.

- Fukino K, Shen L, Patocs A, Mutter GL, Eng C. Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *JAMA* 2007, 297: 2103-11.
- Fukuyama R, Niculaita R, Ng KP, Obusez E, Sánchez J, Kalady M, Aung PP, Casey G, Sizemore N. Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses β -catenin-dependent transcription. *Oncogene* 2008, 27: 6044-6055.
- Furuhashi M, Sjöblom T, Abramsson A, Ellingsen J, Micke P, Li H, Bergsten-Folestad E, Eriksson U, Heuchel R, Betsholtz C, Heldin CH, Ostman A. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res* 2004, 64: 2725-33
- Gao J, Arbman G, Rearden A, Sun XF. Stromal staining for PINCH is an independent prognostic indicator in colorectal cancer. *Neoplasia* 2004, 6: 796-801.
- Gerdes H. Colon cancer and the p53 oncogene. *Gastroenterology* 1991, 100: 842-843.
- Giehl K, Menke A. Microenvironmental regulation of E-cadherin-mediated adherens junctions. *Front Biosci* 2008, 13: 3975-85.
- Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001, 131: 3109S-3120S.
- Globocan 2008, IARC, 2010
- Gomez I, Peña C, Herrera M, Muñoz C, Larriba MJ, Garcia V, Dominguez G, Silva J, Rodriguez R, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Garcia JM. TWIST1 is expressed in colorectal carcinomas and predicts patient survival. *PLoS One* 2011, 6: e18023.
- Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* 2008, 1: 69–83.
- Grinnell RS. The grading and prognosis of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1939, 109: 500-533.
- Gruber SB, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer, crash sites, and the new genetics of neoplasia. *Gastroenterology* 1999, 116: 210-212.

- Gundem G, Lopez-Bigas N. Sample-level enrichment analysis unravels shared stress phenotypes among multiple cancer types. *Genome Med* 2012, 4: 28.
- Gunji N, Oda T, Todoroki T, Kanazawa N, Kawamoto T, Yuzawa K, Scarpa A, Fukao K. Pancreatic carcinoma: correlation between E-cadherin and alpha-catenin expression status and liver metastasis. *Cancer* 1998, 82: 1649-56.
- Guo X, Oshima H, Kitmura T, Taketo MM, Oshima M. Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem* 2008, 283: 19864-71.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144: 646-74.
- Harper J, Sainson RC. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin Cancer Biol* 2014, 25C: 69-77.
- Hartsough MT, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *J Bioenerg Biomembr* 2000, 32: 301-308.
- Hasumi Y, Kłosowska-Wardega A, Furuhashi M, Ostman A, Heldin CH, Hellberg C. Identification of a subset of pericytes that respond to combination therapy targeting PDGF and VEGF signaling. *Int J Cancer* 2007, 121: 2606-14.
- Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Luger N, Domschke W, Binion DG. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003, 278: 8508-15.
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004, 4: 806-13.
- Henry LR, Lee HO, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA, Chen WT, Cheng JD. Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13: 1736-41.
- Hua X, Yu L, Pan W, Huang X, Liao Z, Xian Q, Fang L, Shen H. Increased expression of Golgi phosphoprotein-3 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis of prostate cancer. *Diagn Pathol* 2012, 7: 127.

- Huang D, Du X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* 2008, 14: 1823-7.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007, 356: 2271-81.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004, 350: 2335-42.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004, 54: 8-29.
- Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD, Menck HR, Winchester DP. The National Cancer Data Base. Report on colon cancer. *Cancer* 1996, 78: 918-926.
- Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L. Thymidilate synthase gene and protein expression correlate and are associated with a response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995, 55: 1407-1412.
- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009, 9:239-252.
- Juan TY, Roffler SR, Hou HS, Huang SM, Chen KC, Leu YL, Prijovich ZM, Yu CP, Wu CC, Sun GH, Cha TL. Antiangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2009, 15: 4600-11.
- Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006, 6: 392-401.
- Kanagawa N, Niwa M, Hatanaka Y, Tani Y, Nakagawa S, Fujita T, Yamamoto A, Okada N. CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma. *Int J Cancer* 2007, 121: 2013-22.

- Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic MAS, Ferencic Z, Tavassoli M, Primorac D, Sonicki Z, Spaventi S, Pavelic K, Spaventi R. The expression of p185/HER-2 neu correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997, 112: 1103-1112.
- Kaplan CD, Krüger JA, Zhou H, Luo Y, Xiang R, Reisfeld RA. A novel DNA vaccine encoding PDGFRbeta suppresses growth and dissemination of murine colon, lung and breast carcinoma. *Vaccine* 2006, 24: 6994-7002.
- Karlen P, Lofberg R, Brostrom O, Leijonmarck CE, Hellers G. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 1999, 94: 1047-1052.
- Katoh M, Katoh M. Integrative genomic analyses of ZEB2: Transcriptional regulation of ZEB2 based on SMADs, ETS1, HIF1alpha, POU/OCT, and NF-kappaB. *Int J Oncol* 2009, 34: 1737-42.
- Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells* 2014, 32: 145-56.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991, 251: 1366-1370.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996, 87: 159-170.
- Kirchner T, Brabletz T. Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation. *Am J Pathol* 2000, 157: 1113-21.
- Kiskowski MA1, Jackson RS 2nd, Banerjee J, Li X, Kang M, Iturregui JM, Franco OE, Hayward SW, Bhowmick NA. Role for stromal heterogeneity in prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2011, 71: 3459-70.
- Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Fidler IJ. Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *Am J Pathol* 2006, 169: 2054-65.

- Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, Hamilton SR, Fidler IJ. Expression of activated platelet-derived growth factor receptor in stromal cells of human colon carcinomas is associated with metastatic potential. *Int J Cancer* 2006, 119: 2567-74.
- Klapholz-Brown Z, Walmsley GG, Nusse YM, Nusse R, Brown PO. Transcriptional program induced by Wnt protein in human fibroblasts suggests mechanisms for cell cooperativity in defining tissue microenvironments. *PLoS One* 2007, 2: e945.
- Knekt P, Hakama M, Jarvinen R, Pukkala E, Heliovaara M. Smoking and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998, 78: 136-139.
- Knudson AJ. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985, 45: 1437-1443.
- Koshida Y, Kuranami M, Watanabe M. Interaction between stromal fibroblasts and colorectal cancer cells in the expression of vascular endothelial growth factor. *J Surg Res* 2006, 134: 270-7.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* 2006, 66: 632-7.
- Koyama S. Coordinate cell-surface expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors on cancer-associated myofibroblasts from malignant ascites in patients with gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005, 131: 809-14.
- Kunigou O, Nagao H, Kawabata N, Ishidou Y, Nagano S, Maeda S, Komiya S, Setoguchi T. Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma. *Oncol Rep* 2011, 26: 1337-42.
- Kuwai T, Nakamura T, Kim SJ, Sasaki T, Kitadai Y, Langley RR, Fan D, Hamilton SR, Fidler IJ. Intratumoral heterogeneity for expression of tyrosine kinase growth factor receptors in human colon cancer surgical specimens and orthotopic tumors. *Am J Pathol* 2008, 172: 358-66.
- Kwak JM, Lee HJ, Kim SH, Kim HK, Mok YJ, Park YT, Choi JS, Moon HY. Expression of protein S100A4 is a predictor of recurrence in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2010, 16: 3897-904.

- Lagergren J, Ye W, Ekbom A. Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis? *Gastroenterology* 2001, 121:542-7
- Lai D, Ma L, Wang F. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 2012, 41: 541-50.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 1998, 48: 6-29.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993, 75: 215-225.
- Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996, 56: 4625-9.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998, 396: 643-649.
- Lewis JD, Deren JJ, Lichtenstein GR. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999, 28: 459-477.
- Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007, 101: 805–15.
- Li H, Guo L, Chen SW, Zhao XH, Zhuang SM, Wang LP, Song LB, Song M. GOLPH3 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in patients with clinically N0 oral tongue cancer. *J Transl Med* 2012, 10: 168.
- Lim KP, Cirillo N, Hassona Y, Wei W, Thurlow JK, Cheong SC, Pitiyage G, Parkinson EK, Prime SS. Fibroblast gene expression profile reflects the stage of tumour progression in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2011, 223: 459-69.
- Lindblom A. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol* 2001, 13: 63-69.
- Little J, Sharp L, Duthie S, Narayanan S. Colon cancer and genetic variation in folate metabolism: the clinical bottom line. *J Nutr* 2003, 133: 3758S-3766S.

- Loeffler M, Krüger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 2006, 116: 1955-62.
- Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012, 196: 395-406.
- Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004, 6: 297-305.
- Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002, 16: 775-810.
- Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, Mongin SJ, Snover DC, Schuman LM. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000, 343: 1603-1607.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454: 436-444.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004, 25: 677-86.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002, 23: 549-55.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009, 27: 451-83.
- Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol* 2014, 25C: 47-60.
- Matsumoto N, Yoshida T, Yamashita K, Numata Y, Okayasu I. Possible alternative carcinogenesis pathway featuring microsatellite instability in colorectal cancer stroma. *Br J Cancer* 2003, 89: 707-12.

- Mazzocca A, Coppari R, De Franco R, Cho JY, Libermann TA, Pinzani M, Toker A. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 2005, 65: 4728-38.
- McTiernan A, Ulrich C, Slate S, Potter J. Physical activity and cancer etiology: associations and mechanisms. *Cancer Causes Control* 1998, 9: 487-509.
- Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 665-74.
- Migita T, Inoue S. Implications of the Golgi apparatus in prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2012 44: 1872-6.
- Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007, 357: 2666-76.
- Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A, Chaffey JT. Potentially curative surgery of colon cancer: the influence of blood vessel invasion. *J Clin Oncol* 1988, 6: 119-127.
- Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A. Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 1989, 17: 311-318.
- Miyaki M, Nishio J, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Nagato M, Chong JM, Koike M, Terada T, Kawahara Y, Fukutome A, Tomiyama J, Chuganji Y, Momoi M, Utsunomiya J. Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome. *Oncogene* 1997, 15: 2877-2881.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995, 25: 1101-4.
- Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2002, 160: 985-1000.
- Motzer RJ, Basch E. Targeted drugs for metastatic renal cell carcinoma. *Lancet* 2007, 370: 2071-3.

- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczyluk C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007, 356: 115-24.
- Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X, Broering DC. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 2007, 171: 1608-18.
- Muñoz A. Cáncer: genes y nuevas terapias. Feduchi E e Irurzun A (eds). Editorial Hélice. Madrid, 1997.
- Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 2011, 89: 557-63.
- Murtaugh MA, Ma KN, Sweeney C, Caan BJ, Slattery ML. Meat consumption patterns and preparation, genetic variants of metabolic enzymes, and their association with rectal cancer in men and women. *J Nutr* 2004, 134: 776-784.
- Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin EW Jr, de la Chapelle A, Frankel WL. Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 2004, 23: 7366-77.
- Nardin A, Abastado JP. Macrophages and cancer. *Front Biosci* 2008, 13: 3494-505.
- Navab R, Strumpf D, Bandarchi B, Zhu CQ, Pintilie M, Ramnarine VR, Ibrahimov E, Radulovich N, Leung L, Barczyk M, Panchal D, To C, Yun JJ, Der S, Shepherd FA, Jurisica I, Tsao MS. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108: 7160-5.
- Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Tsujino T, Man-i M, Ikeda JI, Konishi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007, 96: 986-92.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994, 371: 75-80.

- Norton SA, Thomas MG. Staging of rectosigmoid neoplasia with colonoscopic endoluminal ultrasonography. *Br J Surg* 1999, 86: 942-946.
- O'Brien MJ, Winauer SJ, Zauber AG, Gottlich LS, Sternberg SS, Diaz B, Dickersin R, Ewing S, Geller S, Karimian D, Komorowski R, Szporn A. The National Polyp Study: Determinants of high grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990, 98: 371-379.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009, 324: 1457-61.
- Ong SM, Tan YC, Beretta O, Jiang D, Yeap WH, Tai JJ, Wong WC, Yang H, Schwarz H, Lim KH, Koh PK, Ling KL, Wong SC. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *Eur J Immunol* 2012 Jan;42(1):89-100.
- Ono M, Torisu H, Fukushi J, Nishie A, Kuwano M. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, 43 Suppl: S69-71.
- Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006, 5: 1597-601.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005, 121: 335-48.
- Orr B, Riddick AC, Stewart GD, Anderson RA, Franco OE, Hayward SW, Thomson AA. Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. *Oncogene* 2012, 31: 1130-42.

- Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev* 2009, 19: 67-73.
- Otchy DP, Ransohoff DF, Wolff BG, Weaver A, Ilstrup D, Carlson H, Rademacher D. Metachronous colon cancer in persons who have had a large adenomatous polyp. *Am J Gastroenterol* 1996, 91: 448-454.
- Paget S. The distributions of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889, 1: 571-573.
- Papadopoulus N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994, 263: 1625-1629.
- Patocs A, Zhang L, Xu Y, Weber F, Caldes T, Mutter GL, Platzer P, Eng C. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases. *N Engl J Med*. 2007, 357: 2543-51.
- Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* 2003, 52: 861-867.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007, 7: 415-28.
- Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-myc. *Arch Biochem Biophys* 2003, 416: 129-136.
- Peña C, Céspedes MV, Lindh MB, Kiflemariam S, Mezheyeuski A, Edqvist PH, Hägglöf C, Birgisson H, Bojmar L, Jirström K, Sandström P, Olsson E, Veerla S, Gallardo A, Sjöblom T, Chang AC, Reddel RR, Mangues R, Augsten M, Ostman A. STC1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer. *Cancer Res* 2013, 73: 1287-97.
- Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, Butler JA, Puckett ML, Hildebrandt HA, Wong RK, Nugent PA, Mysliwiec PA, Schindler WR. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003, 349: 2191-2200.
- Pietras K, Ostman A, Sjöquist M, Buchdunger E, Reed RK, Heldin CH, Rubin K. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial

- hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 2001, 61: 2929-34.
- Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 2008, 5: e19.
 - Pietras K, Rubin K, Sjöblom T, Buchdunger E, Sjöquist M, Heldin CH, Ostman A. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 2002, 62: 5476-84.
 - Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999, 277: C183-201.
 - Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010, 141: 39–51.
 - Ramsay RG, Gonda TJ. MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2008, 8:523-534.
 - Rao CV, Wang CQ, Simi B, Rodriguez JG, Cooma I, El Bayoumy K, Reddy BS. Chemoprevention of colon cancer by a glutathione conjugate of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, a novel organoselenium compound with low toxicity. *Cancer Res* 2001, 61: 3647-3652.
 - Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 2010, 316: 2713–22.
 - Rashid A, Houlihan PS, Booker S, Petersen GM, Giardiello FM, Hamilton SR. Phenotypic and molecular characteristics of hyperplastic polyposis. *Gastroenterology* 2000, 119: 323-332.
 - Rembacken BJ, Fujii T, Cairns A, Dixon MF, Yoshida S, Chalmers DM, Axon AT. Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the U K. *Lancet* 2000, 355: 1211-1214.
 - Rex DK. Barium studies/virtual colonoscopy: the gastroenterologist's perspective. *Gastrointest Endosc* 2002, 55: 33-36.

- Rozen P, Fireman Z, Fine N, Wax Y, Ron E. Oral calcium suppresses increased rectal epithelial proliferation of persons at risk of colorectal cancer. *Gut* 1989, 30: 650-655.
- Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 83-90.
- Saadi A, Shannon NB, Lao-Sirieix P, O'Donovan M, Walker E, Clemons NJ, Hardwick JS, Zhang C, Das M, Save V, Novelli M, Balkwill F, Fitzgerald RC. Stromal genes discriminate preinvasive from invasive disease, predict outcome, and highlight inflammatory pathways in digestive cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107: 2177-82.
- Sadlonova A, Bowe DB, Novak Z, Mukherjee S, Duncan VE, Page GP, Frost AR. Identification of molecular distinctions between normal breast-associated fibroblasts and breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron* 2009, 2: 9-21.
- Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res* 2008, 68: 10267-79.
- Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kaariainen H, Ahtola H, Eskelinen M, Harkonen N, Julkunen R, Kangas E, Ojala S, Tulikoura J, Valkamo E, Jarvinen H, Mecklin JP, Aaltonen LA, de la CA. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000, 18: 2193-2200.
- Salvesen HB, Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 1999 84: 538-43.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006, 355: 2542-50.
- Sasaki T, Kitadai Y, Nakamura T, Kim JS, Tsan RZ, Kuwai T, Langley RR, Fan D, Kim SJ, Fidler IJ. Inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation on tumor-associated endothelial

cells leads to treatment of orthotopic human colon cancer in nude mice. *Neoplasia* 2007, 9: 1066-77.

- Satia-Abouta J, Galanko JA, Martin CF, Ammerman A, Sandler RS. Food groups and colon cancer risk in African-Americans and Caucasians. *Int J Cancer* 2004, 109: 728-736.
- Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006, 25: 7531-7.
- Sheehan KM, Gulmann C, Eichler GS, Weinstein JN, Barrett HL, Kay EW, Conroy RM, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Signal pathway profiling of epithelial and stromal compartments of colonic carcinoma reveals epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 2008, 27: 323-31
- Shibata D, Schaeffer J, Li ZH. Genetic heterogeneity of the c-k-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85: 1058-1063.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 2008, 41: 278-86.
- Shinya H, Wolff WI. Morphology, anatomic distribution, and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg* 1979, 190: 679-683.
- Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T. Prognostic evaluation of perineural invasion in rectal cancer. *Am J Surg* 1993, 165: 233-237.
- Sica A, Sacconi A, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol* 2002, 2: 1045-54.
- Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients curable colorectal tumors. *Science* 1992, 256: 102-105.
- Sindrilariu A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkötter C, Scharffetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest* 2011, 121: 985-97.

- Smyrk TC. Colon cancer connections. Cancer syndrome meets molecular biology meets histopathology. *Am J Pathol* 1994, 145: 1-6.
- Song S, Ewald AJ, Stallcup W, Werb Z, Bergers G. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* 2005, 7: 870-9.
- Sonvilla G, Allerstorfer S, Stättner S, Karner J, Klimpfinger M, Fischer H, Grasl-Kraupp B, Holzmann K, Berger W, Wrba F, Marian B, Grusch M. FGF18 in colorectal tumour cells: autocrine and paracrine effects. *Carcinogenesis* 2008, 29: 15-24.
- Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993, 75: 951-957.
- Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 1994, 139: 1-15.
- Su LK. Molecular Biology of Colorectal Cancer. Abbruzzese, Evans, Willett (eds). *Gastrointestinal Oncology* 2004, pp 635-644
- Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2006, 5: 1640-6.
- Sugiura D, Aida S, Denda-Nagai K, Takeda K, Kamata-Sakurai M, Yagita H, Irimura T. Differential effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases. *Cancer Sci* 2008, 99: 2477-84.
- Sugiyama Y, Farrow B, Murillo C, Li J, Watanabe H, Sugiyama K, Evers BM. Analysis of differential gene expression patterns in colon cancer and cancer stroma using microdissected tissues. *Gastroenterology* 2005, 128: 480-6.
- Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol* 2008, 18: 288-95.

- Tchou J, Kossenkova AV, Chang L, Satija C, Herlyn M, Showe LC, Puré E. Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Med Genomics* 2012, 5: 39.
- Terry P, Bergkvist L, Holmberg L, Wolk A. Coffee consumption and risk of colorectal cancer in a population based prospective cohort of Swedish women. *Gut* 2001, 49: 87-90.
- Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 2004, 64: 3731-6.
- Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S. An update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 1998, 85: 1670-1676.
- Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13: 2082-90.
- Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003, 107: 541-50.
- Varro A, Kenny S, Hemers E, McCaig C, Przemeck S, Wang TC, Bodger K, Pritchard DM. Increased gastric expression of MMP-7 in hypergastrinemia and significance for epithelial-mesenchymal signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 292: G1133-40.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988, 319: 525-532.
- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989, 244: 207-211.
- Wang JH, Chen XT, Wen ZS, Zheng M, Deng JM, Wang MZ, Lin HX, Chen K, Li J, Yun JP, Luo RZ, Song LB. High expression of GOLPH3 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *PLoS One* 2012, 7: e45622.

- Wang ZH, Ding KF, Yu JK, Zhai XH, Ruan SQ, Wang SW, Zhu YL, Zheng S, Zhang SZ. Proteomic analysis of primary colon cancer-associated fibroblasts using the SELDI-ProteinChip platform. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012, 13: 159-67.
- Wildiers H, Guetens G, De Boeck G, Verbeken E, Landuyt B, Landuyt W, de Bruijn EA, van Oosterom AT. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *Br J Cancer* 2003, 88: 1979-86.
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004, 10: 145-7.
- Willett WC. Diet and cancer. *Oncologist* 2000, 5: 393-404.
- Winauer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlich LS, Sternberg SS, Wayne JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, Ackrodt F, Shike M, Kartz RC, Hornsby-Lewis L, Gerdes H, Steward EJ, and the National Polyp Study Workgroup. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 1993, 329: 1977-1981.
- Worthley DL, Giraud AS, Wang TC. Stromal fibroblasts in digestive cancer. *Cancer Microenviron* 2010, 3: 117-25.
- Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 2009, 15: 416-28.
- Xian X, Håkansson J, Ståhlberg A, Lindblom P, Betsholtz C, Gerhardt H, Semb H. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest* 2006, 116: 642-51.
- Xouri G, Christian S. Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Semin Cell Dev Biol* 2010, 21: 40-6.
- Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, Nannini-Pepe M, Kotkow K, Marsters JC, Rubin LL, de Sauvage FJ. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 2008, 455: 406-10.

- Yokoi K, Sasaki T, Bucana CD, Fan D, Baker CH, Kitadai Y, Kuwai T, Abbruzzese JL, Fidler IJ. Simultaneous inhibition of EGFR, VEGFR, and platelet-derived growth factor receptor signaling combined with gemcitabine produces therapy of human pancreatic carcinoma and prolongs survival in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2005, 65: 10371-80.
- Yonenaga Y, Mori A, Onodera H, Yasuda S, Oe H, Fujimoto A, Tachibana T, Imamura M. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* 2005, 69: 159-66.
- Zeng Z, Lin H, Zhao X, Liu G, Wang X, Xu R, Chen K, Li J, Song L. Overexpression of GOLPH3 promotes proliferation and tumorigenicity in breast cancer via suppression of the FOXO1 transcription factor. *Clin Cancer Res* 2012, 18: 4059-69.

PÁGINAS WEB

- www.aecc.es
- www.atcc.org
- www.seom.org
- www.who.int/cancer/en

ANEXOS

